

ACTA

PHARMACEUTICA HUNGARICA

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata

3.

2013

APHGAO 83, (043) 69–104. (2013)



A C T A PHARMACEUTICA H U N G A R I C A

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság folyóirata

Főszerkesztő:

Noszál Béla, Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet
1092 Budapest, Hőgyes E. u. 9.
Tel.: 217-0891;
E-mail: nosbel@hogyes.sote.hu

Felelős szerkesztő:

Zelkó Romána, Semmelweis Egyetem, Egyetemi Gyógyszertár,
Gyógyszerügyi Szervezési Intézet,
1092 Budapest, Hőgyes E. u. 7–9.
Tel.: 217-0927;
E-mail: zelrom@hogyes.sote.hu

A szerkesztőbizottság tagjai:

Báthori Mária, Erős István, Gunda Tamás, Perjési Pál,
Tóthfalusi László

A szerkesztőség címe – Correspondence:

Acta Pharmaceutica Hungarica
1092 Budapest, Hőgyes Endre u. 9.

A főszerkesztő munkatársa:

Hankó Zoltán MGYT,
1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16.
Tel.: 235-0999; fax: 235-0998

TARTALOM

Flachner Beáta, Hajdú István, Dobi Krisztina, Lőrincz Zsolt, Cseh Sándor és Dormán György:

Melanin koncentrálnó hormon receptor-1 (MCHR1) antagonistá kiválasztása
és in vitro biológiai szűrése AequoScreen® esszével.

71

Baska Ferenc, Székely Edina Rita, Szántai-Kis Csaba, Bánhegyi Péter, Hegymegi-Barakonyi Bálint,

Németh Gábor, Breza Nóra, Zsákai Lilian, Greff Zoltán, Pató János, Kéri György, Órfi László: Mycobacterium
tuberculosis ellenes hatóanyagok fejlesztése és szerkezet-hatás összefüggéseinek vizsgálata

88

Sebe István, Petzke Máté, Zelkó Romána, Szabó Barnabás: Nano- és mikroszálás rendszerek előállítása
és gyógyszerészeti alkalmazásuk lehetőségei I.

96

CONTENTS

<i>Flachner, B., Hajdú, I., Dobi, K., Lőrincz, Zs., Cseh, S., Dormán, Gy.:</i> Selection of a melanine concentrating hormone receptor-1 (MCHR1) antagonists' focused library and its biological screening with AequeoScreen.	71
<i>Baska, F., Székely, E.R., Szántai-Kis, Cs., Bánhegyi, P., Hegymegi-Barakonyi, B., Németh, G., Breza, N., Zsákai, L., Greff, Z., Pató, J., Kéri, Gy., Őrfi, L.:</i> Development and Structure-Activity Relationship Studies of Inhibitors Against Mycobacterium tuberculosis.	88
<i>Sebe, I., Petzke, M., Zelkó, R., Szabó, B.:</i> Preparation and pharmaceutical application possibilities of nano- and microfiber systems I.	96

Melanin koncentráló hormon receptor-1 (MCHR1) antagonisták fókuszált könyvtár kiválasztása és *in vitro* biológiai szűrése AequeScreen® esszével

FLACHNER BEÁTA, HAJDÚ ISTVÁN, DOBI KRISZTINA, LŐRINCZ ZSOLT,
CSEH SÁNDOR ÉS DORMÁN GYÖRGY*

TargetEx, H-2120 Kápolna köz 4/a, Dunakeszi, Hungary

*Levelezési cím: dorman@targetex.com

Summary

Flachner, B., Hajdú, I., Dobi, K., Lőrincz, Zs., Cseh, S., Dormán, Gy.: **Selection of a melanine concentrating hormone receptor-1 (MCHR1) antagonists' focused library and its biological screening with AequeScreen®**

Target focused libraries can be rapidly selected by 2D virtual screening methods from multimillion compounds' repositories if structures of active compounds are available. In the present study a multi-step virtual and *in vitro* screening cascade is reported to select Melanin Concentrating Hormone Receptor-1 (MCHR1) antagonists. The 2D similarity search combined with physico-chemical parameter filtering is suitable for selecting candidates from multimillion compounds' repository. The seeds of the first round virtual screening were collected from the literature and commercial databases, while the seeds of the second round were the hits of the first round. *In vitro* screening underlined the efficiency of our approach, as in the second screening round the hit rate (8.6 %) significantly improved compared to the first round (1.9%), reaching the antagonist activity even below 10 nM.

Keywords: 2D similarity selection, virtual screening, Melanine concentrating hormone receptor-1 (MCHR1) antagonists, *in vitro* screening, AequeScreen®, physico-chemical parameter space filtering

Összefoglalás

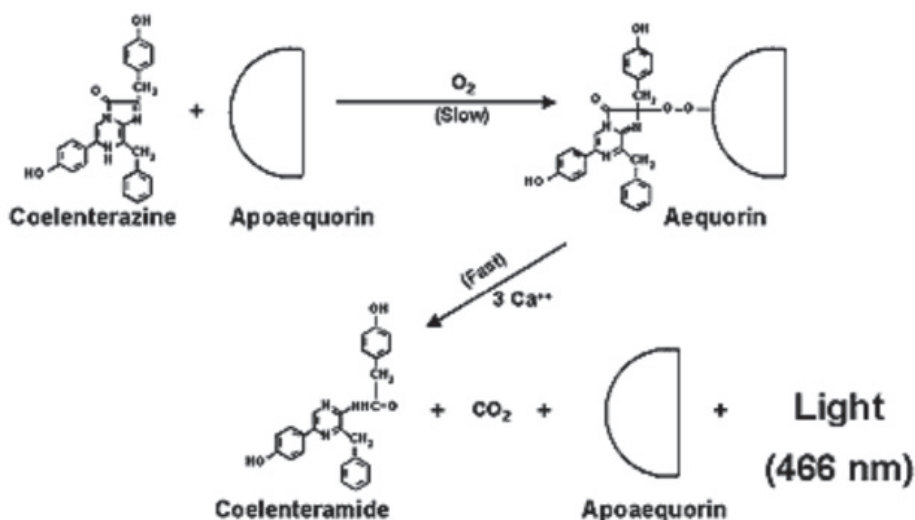
Fehérje célpontra fókuszált molekulakönyvtárakat gyorsan és hatékonyan választhatunk ki 2D hasonlósági kereséssel kereskedelmi forrásokból elérhető több milliós vegyületkészletekből. A jelen közleményünkben egy több lépéses virtuális és *in vitro* szűrési stratégiát mutatunk be a melanin koncentráló hormon receptor-1 (MCHR1) antagonisták kiválasztására. A fókuszált könyvtár kiválasztásakor a 2D hasonlósági keresést ismert antagonisták fiziko-kémiai paraméter terére történő szűréssel kombináltuk. Az első körös virtuális szűréshez az ismert aktív ún. „mag” (seed) vegyületeket az irodalomból ill. elérhető kereskedelmi adatbázisokból gyűjtöttük össze, míg a második körös szűréshez a „mag” vegyületek az első körös biológiai szűrés találatai voltak. A két lépcsős 2D virtuális szűrési stratégia hatékonyságát az *in vitro* biológiai szűrés egyértelműen igazolta, mivel a második körös szűrés találati aránya (8,6%) jelentősen növekedett az első körös szűrés találati arányához képest (1,9%-ról) és a legaktívabb vegyületek 10 nM alatti koncentrációban fejtették ki az antagonisták hatását.

Kulcsszavak: 2D hasonlósági keresés, virtuális szűrés, Melanine koncentráló hormon receptor-1 (MCHR1) antagonisták, *in vitro* biológiai szűrés, AequeScreen®, fiziko-kémiai paraméter tér szűrés.

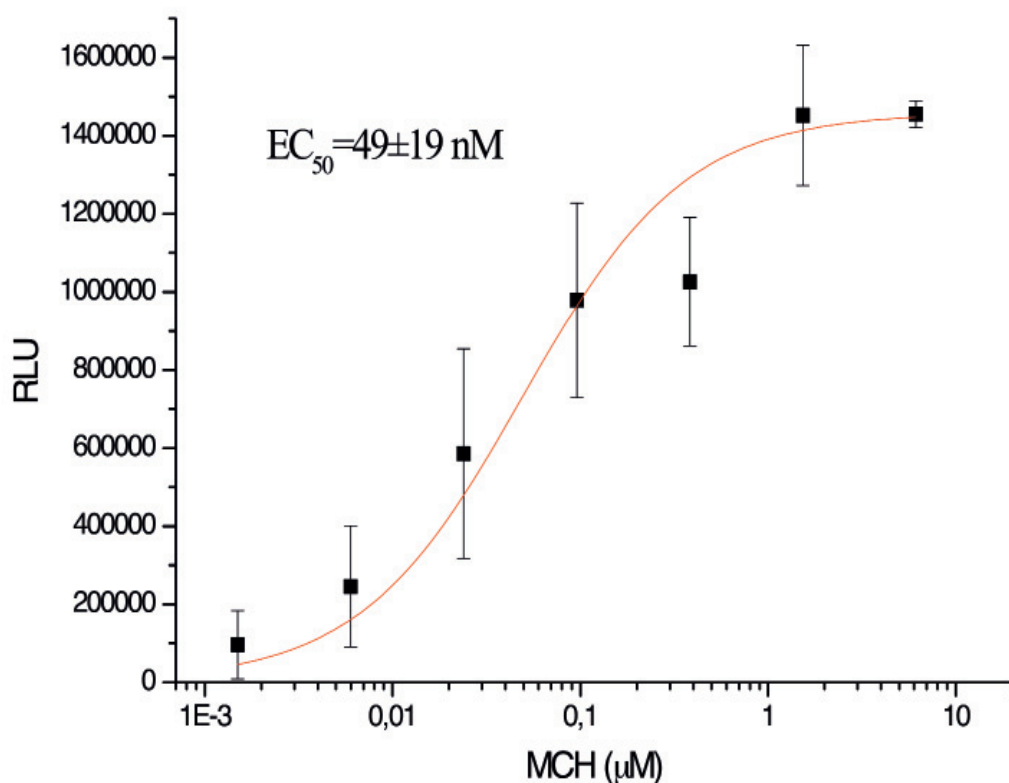
Bevezetés

A melanin koncentráló hormon receptor-1 (MCHR1) a G-fehérje csatolt receptorok családjába tartozik, ami a fehérjecélpontok között megkülönböztetett kémiai, biológiai tulajdonságokkal rendelkezik. MCH egy 19 aminosavat tartalmazó rövid peptid, ami fontos szerepet játszik az étkezési viselkedés, hangulat, alvás-ébredés ciklus és energia egyensúly szabályozásában. Mivel bizonyított, hogy MCH bevitel növeli a táplálékfelvételt és a súlygyarapodást, az antagonisták hatékony megoldást jelenthetnek az elhízás (másnéven obezitás) kezelésében [1].

Amennyiben új antagonistákat kívánunk azonosítani nagyszámú, véletlenszerűen válogatott molekulákból álló ún. felfedező könyvtárat szűrhetünk le a nagy áteresztőképességű biológiai szűrés módszerével. A gyógyszerkutatás egyik új, költséghatékony irányzatában ehelyett úgynevezett fókuszált könyvtárakat (adott célfehérjére vagy célfehérje családokra [2]) tervezünk, ill. választunk ki, amelyek molekulái egy adott biológiai célponttal nagyobb valószínűséggel lépnek kölcsönhatásba és bizonyulnak aktívnak. Az ilyen könyvtárak mérése költséghatékonyabb, mert biológiai szűrésre már csak kisebb számú vegyületet kell rendelkezésre bocsátani, másrészt a találati



1. ábra: AequoScreen® esszé működési elve

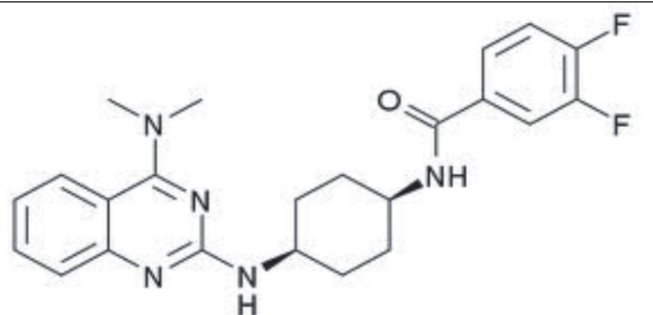
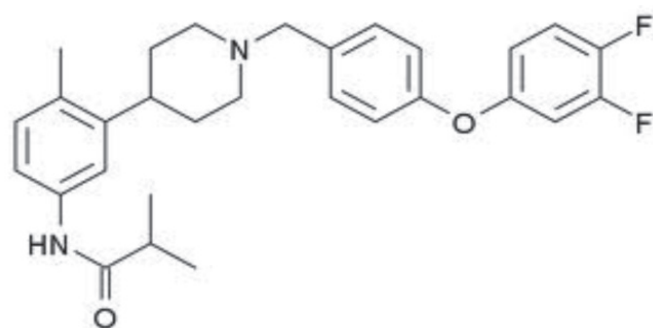


2. ábra: MCH aktiválási görbe

arány a felfedező könyvtárak esetén tapasztalt 0,1%-os értéknél várhatóan egy nagyságrenddel nagyobb, meghaladhatja az 1%-ot [3].

Az elmúlt években a számítógépes modellezés

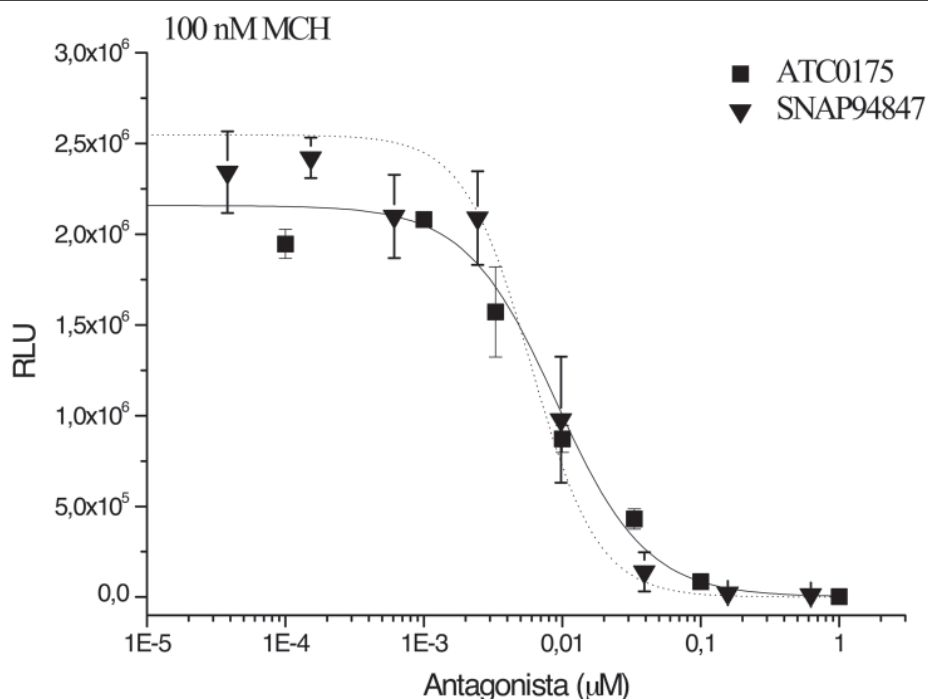
és kapacitásbővülés fejlődésével az *in silico* szűrési technikák egyre nagyobb teret hódítottak [4], ennek eredményeként a 2D molekuláris fingerprin-ten alapuló hasonlósági keresés sikeresség és haté-

**ATC0175****SNAP94847**

3. ábra: A szűrőrendszer validálására kiválasztott
MCH R1 antagonisták

konyság szempontjából felveszi a versenyt a komplex 3D módszerekkel. Stratégiánk így a 2D hasonlósági keresésen alapult a diverzitás és tulajdonosság alapú szűréssel kombinálva. A 2D hasonlósági keresés elemei: 1. Az aktív „referencia” kémiai teret az elérhető gyógyszerkémiai adatbázisokból ill. releváns publikációkból nyert ismert antagonisták, agonisták, gátlószerek képezik az adott fehérje célpontra. 2. A virtuális szűrés alapjául szolgáló ún. gyógyszerjellegű kémiai teret leképező adatbázist (5-25 millió molekula) a molekulakönyvtár beszállító cégek adatbázisai jelentik.

A gyógyszerjellegűség megközelítésére korábban Lipinski állított fel empirikus szabályokat, amelyek az orális felszívódás szempontjából kedvező paramétereket foglalják össze [5]. A Lipinski szabályok (molekula tömeg < 500, hidrogén donorok száma (OH+NH) < 5, hidrogén akceptorok (O+N) < 10, LogP < 5) és Veber-szabályok [6] (10 vagy kevesebb rotálható kötés valamint a poláris felület területe azonos vagy kevesebb mint 140



4. ábra: Referencia antagonisták gátlási görbéi. Az ATC175 esetén $IC_{50}=8,96\pm1,3$ nM, míg a SNAP94847 esetén $IC_{50}=7,65\pm1,3$ nM.

Δ^2) helyett azonban ezen paraméterekre a referencia vegyületek által alkotott ún. tulajdonság (paraméter) teret állapítottuk meg, amely jellemző az adott fehérje célponttal kölcsönható kismolekulákra. Ez a paraméter tér valójában a farmakofór jellemzőket tükrözi vissza statisztikai alapon. A fenti 6 legfontosabb fiziko-kémiai paraméter (móltömeg, LogP, HBA, HBD, rotálható csoportok, topologikus poláris-felület-területe (TPSA)) referencia vegyületek által alkotott intervalluma, így jól alkalmazható a hasonlósági keresés szűkítésére, amit végül diverzitás szűréssel egészítettünk ki, az *in vitro* szűrés áteresztőképeségéhez alkalmazkodva.

Munkánk során tehát célul tűztük ki a MCH R1 antagonistá fókuszált könyvtár kiválasztását és az időközben kifejlesztett *in vitro* biológiai szűrés kapacitással a könyvtár aktivitásának validálását.

2. Módszerek

2. 1. *In vitro* biológiai szűrés

AequoScreen[®] esszé

A human MCH-R1 receptort stabilan expresszáló sejtvonal (PerkinElmerES-370-AV), a receptor génjén kívül stabilan expresszálja az Aequirin és a $G_{\alpha 16}$ fehérjét. Az *Aequorea victoria* medúzából származó Aequirin Ca^{2+} szenzitív biolumineszcens fehérje. Az Aequirin komplex Ca^{2+} kötés hatására kék fényt bocsát ki, amely 466 nm-en detektálható. A módszer működését az 1. ábra szemlélteti.

A mérés során a 70% konfluenciájú sejteket 0,02% EDTA-val felszedjük, centrifugáljuk és mérő médiumba (DMEM/F12 fenol vörös mentes médium (Sigma D6434) + 2mM glutamin +0,1% BSA) felvesszük (1 millió sejt/ml koncentrációban), 5 μ M *Coelenterazine h*-val (Invitrogen C6780) éjszakán át szobahőmérsékleten (25 °C) lassú (7 rpm) forgatás mellett inkubáljuk. Reggel mérő médiummal 10x-re hígítjuk és további 1 órán át inkubáljuk.

MCH aktiválási görbe meghatározása

A mérést 96 lyukú OptiplateTM-en végeztük (PerkinElmer 6005290) és a lumineszcens jelet AppliskanTM (Thermo) injektoros plate reader-rel detektáltuk. A mérést lyukanként végeztük, ahol 5 s alapvonal felvétele után injektáltunk és mértük a jelváltozást 30 s-ig. MCH aktiválási görbe felvételénél a plate-en 50 μ l, különböző koncentrációjú

MCH (4x hígítási sor) volt és ehhez adagoltunk 50 μ l sejtet. A mért görbe alapján az MCH 49 nM-os EC_{50} értéket mutatott (2. ábra).

MCH-R1 receptor antagonistá gátlásának meghatározása

Az antagonisták gátlásának meghatározását a MCH aktiváláshoz nagyon hasonló módon végeztük el, csak itt a plate-en 45 μ l sejt + 5 μ l mérő médiumba hígított antagonistá volt. 100 nM MCH agonistával indítottuk a reakciót, amit az injektorral adagoltunk (50 μ l). Mindkét kipróbált antagonistánál az IC_{50} értékre jó egyezést kaptunk az irodalomban leírttal, mely ATC175 (3. ábra) esetén $13,5 \pm 0,78$ nM [7], SNAP94847 (3. ábra) esetében $4,48 \pm 1,18$ nM [8] (4. ábra).

A használt módszer nagy jel/háttér arányt (350) és magas Z' faktor értékeket (0,7) produkál többször megismételt független kísérletekben. Elég megbízható és robosztus ahhoz, hogy a tervezett egy pontos méréseket, illetve IC_{50} meghatározásokat végre tudjuk hajtani vele.

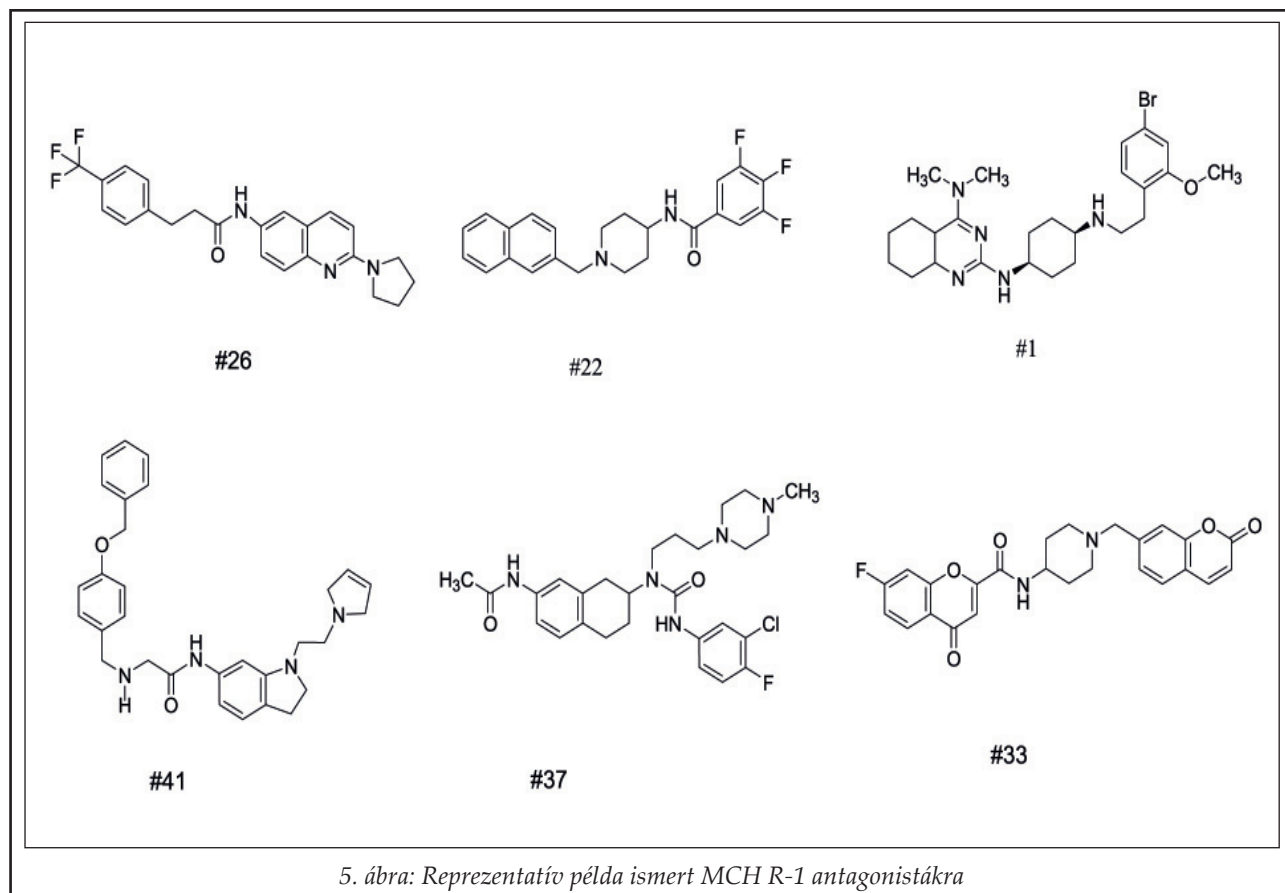
2. 2. Számítógépes módszerek

Fehérjecélpontra fókuszált vegyületkönyvtárak kiválasztása potenciális MCH-R1 antagonisták kifejlesztésére

Az ismert vegyületek szerkezetén alapuló hasonlósági keresés általában 2D molekuláris „ujjlenyomatot” használ, ami valójában bináris sorozatokból („fűzérekből”) áll és egy adott alszerkezet (szubstruktúra) meglétét vagy hiányát kódolja a molekulák összehasonlítása során.

A 2D „ujjlenyomat” alkalmazása különösen előnyös, ha számos aktív (referencia) vegyület szerkezete áll rendelkezésre és többmillió adatbázisokból szeretnénk a szerkezetileg hasonló származékokat kiválasztani [9]. A hasonlóság mérésére a legelterjedtebben a Tanimoto koefficienszt használják [10], ami a mindkét molekulában megtalálható alstruktúrák számának illetve a legalább az egyik molekulában megtalálható alstruktúrák számának a hányadosa [11].

Az elmúlt évek során a hasonlósági keresés hatékonyságának növelésére néhány új technikával egészítették ki ezt a klasszikus módszert. Ezek egyike az ún. fúziós, többszörös hasonlósági értékek bevezetése, amelyek közé tartozik a csoportfúziós módszer (group-fusion) [12] vagy az ún. turbo hasonlósági keresés [13]. Munkánk során az előb-



5. ábra: Reprezentatív példa ismert MCH R-1 antagonistákra

I. táblázat

A 43 MCH R1 referencia vegyületek kalkulált tulajdonságainak szélsőértékei és átlaga

	Referencia vegyületek tulajdonságainak szélsőértékei és átlaga					
	LogP	Mol tömeg	H kötés donor	H kötés akceptorok	tPSA	Rotálható kötések
Maximum	6,984	620,723	3	9	129,310	11
Minimum	1,862	379,926	0	3	23,550	4
Átlag	4,534	477,571	1,2	5,7	62,683	6,4

bit alkalmaztuk a második körös biológiai szűrésre történő fókuszált könyvtár kiválasztásakor.

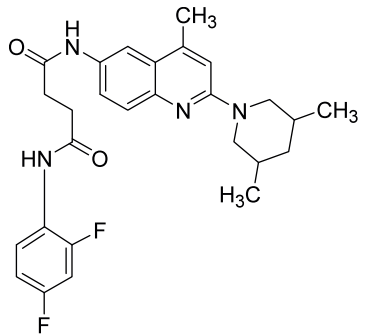
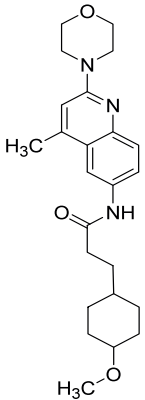
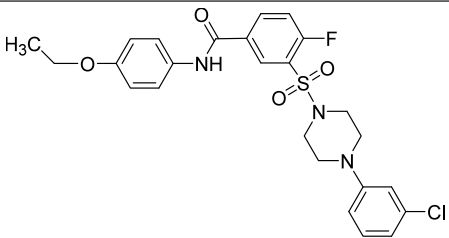
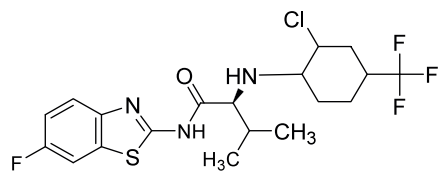
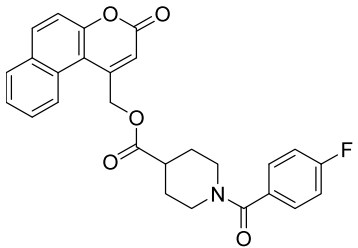
Az ismert gátlószerek 2D szerkezetén alapuló *in silico* válogatás első lépéseként két virtuális könyvtárt hoztunk létre. Az ún. aktív referencia kémiai „teret” az elérhető gyógyszerkémiai adatbázisokból (DrugBank, PubChem, PharmaProjects ill. releváns publikációkból stb.) kiválasztott 43 MCH receptor antagonist (,,seed”/referencia molekula) szerkezete képezi. A virtuális szűrés alapját képező ún. gyógyszerjellegű kémiai teret leképező virtuális könyvtárt pedig teljességében a Zinc adatbázis fedné le (25 M vegyület [14], amely magába foglalja a 13 M kereskedelmi forgalomban elérhető vegyületet a molekulakönyvtár beszállító cégek

adatbázisai alapján. Munkánk során a legismertebb beszállítók adatbázisát szereztük be sdf formátumban (InterBioscreen, ChemDiv, Maybridge, Ukorrg, Specs, Life Chemicals, Enamine, AMRI, Asinex, Kemiome, ChemBridge). Az így rendelkezésre álló kb. 5 M (4 824 416) vegyületet tartalmazó adatbázison hajtottuk végre a 2D hasonlósági keresést az ismert antagonisták szerkezetét alapul véve. A hasonlósági keresést egy Daylight-típusú molekuláris „ujjlenyomaton” alapuló szerkezeti hasonlóságot kereső algoritmust alkalmazó szoftver segítségével hajtottuk végre (Instant JChem, ChemAxon¹, Budapest).

¹ <http://www.chemaxon.com> (Április, 2010); InstJChem v. 5.3.1, 2010, <http://www.chemaxon.com/jchem/doc/user/fingerprint.html>

II. táblázat

Az első körös biológiai szűrés eredménye és a 2. körös hasonlósági keresésre kijelölt referencia vegyületek

Id	Szerkezet	Hasonlóság	Referencia molekula	IC ₅₀ (μM)
6		0,672	26	0,234
4		0,668	26	0,377
11		0,737	22	0,481
1		0,693	39	0,684
12		0,669	33	0,918

A táblázat folytatása a következő oldalon

A hasonlósági keresést elvégezve azonosítottuk a legnagyobb Tanimoto hasonlósági koefficiensű, nagy hasonlóságot mutató gyógyszerjelölt vegyületeket. Keresési határértéknek Tanimoto > 0,65 értéket választottuk. A fiziko-kémiai paraméterek (Mwt, LogP, H-kötés donor/akceptor, rotálható kötések és topológiai poláris felület területe) számolására az Instant JChem, ChemAxon, kalkulációs modulját használtuk, míg a diverzitás szelekcióra a Similarity Manager szoftvert (CompuDrug Int., Sedona, AZ) alkalmaztuk.

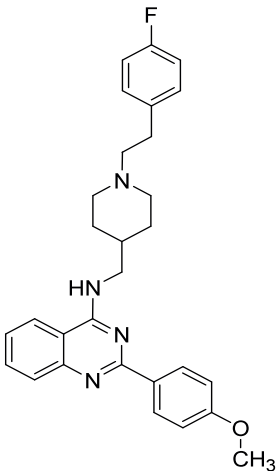
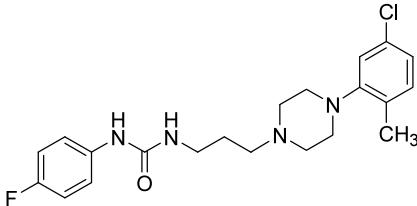
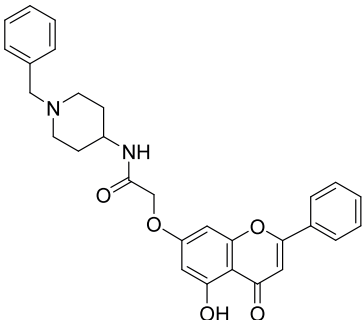
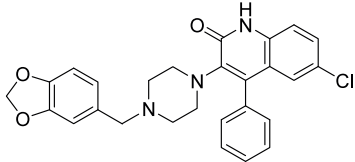
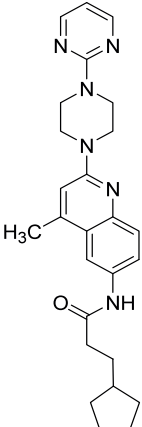
3. Eredmények és diszkusszió

Hasonlósági keresési stratégia potenciális MCH antagonisták kiválasztására

Először a seed-vegyületeket (aktív MCH R1 antagonistákat) és tulajdonságterüket határoztuk meg: összeszedtük az ismert gátlószereket és egyetlen sdf adatbázisban egyesítettük (ez összesen: 43 referencia vegyületet eredményezett). A referencia vegyületeket 3 tipikus molekuláris architektúrát tükröző osztályba tudtuk sorolni (5. ábra):

1. Lineáris elrendeződés, amelyben bázikus amin helyezkedik el legalább a molekula egyik végén. (#26, #41) – A típus.
2. Lineáris elrendeződés, amely bázikus amin hidat tartalmaz a molekula közepén (#22, 1, 33) – B típus.

Folytatás az előző oldalról

Id	Szerkezet	Hasonlóság	Referencia molekula	IC ₅₀ (μM)
10		0,674	1	1,10
7		0,657	37	1,53
3		0,726	33	1,82
2		0,706	27	2,04
5		0,654	26	2,06

3. Y-alakú vagy propeller-szerű elrendeződés amelyben bázikus amin helyezkedik el legalább a molekula egyik végén (#37) – C típus.

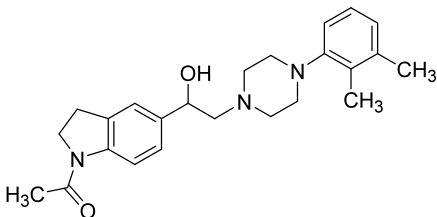
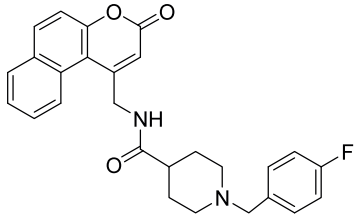
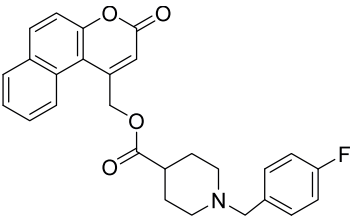
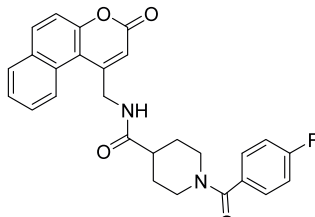
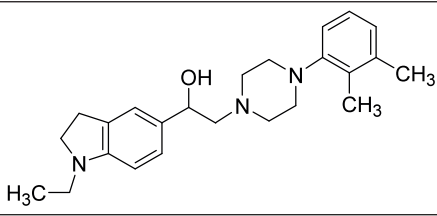
A 3 szerkezeti típus eloszlása a referencia vegyületek között: A : B : C típus = 17 : 19 : 7.

A 3 különböző MCH antagonisták architektúra visszatükrözi a legfontosabb 2D farmakofór jellemzőket, ami megfelel az antagonisták hatás kifejtéséhez szükséges feltételeknek. *Goodnow* szerint: pozitív töltésű csoport (kvaternerizált bázikus amin) és ettől legalább egy távollévő aromás ill. hidrofób régió szükséges az antagonisták hatáshoz [15]. Ezeket a farmakofór jellemzőket statisztikailag fiziko-kémia paraméterekkel ill. az általuk alkotott sajátos paraméter (tulajdonság) térrel közelíthetjük.

A különböző fehérje célpontok ill. célpont családok megkülönböztetett fiziko-kémiai paraméter (tulajdonság) térrel rendelkeznek, amint azt *R. Morphy* tanulmányában kimutatta [16]. Ennek megfelelően meghatároztuk a 44 referencia vegyületet által alkotott un. tulajdonság (paraméter) teret az alábbi fiziko-kémiai paraméterekre: Mwt, LogP, HBA, HBD, (ún. Lipinski-paraméterek), plusz rotálható csoportok ill. topológikus poláris-felület-területe (tPSA). Az így kapott tulajdonságteret (*I. táblázat*) alkalmaztuk későbbiekben a hasonlósági keresés szűkítésére (közvetlenül vagy a

A táblázat folytatása a következő oldalon

Folytatás az előző oldalról

Id	Szerkezet	Hasonlóság	Referencia molekula	IC ₅₀ (μM)
8		0,656	41	2,24
15		Bioizosztér		
14		Bioizosztér		
13		Bioizosztér		
9		Bioizosztér		

meg. Ezek biológiai aktivitását vizsgáltuk az MCH-R1 receptoron, a beállított *in vitro* esszével.

Egy pontos mérések. A 261 megvásárolt antagonistá jelölt előszűrésére egy pontos mérést használtunk (a vegyületeket 10 μM koncentrációban vizsgáltuk). További vizsgálatra azt a 48 anyagot választottuk ki, amelyek maradék aktivitása kisebb, mint 30% volt.

IC₅₀ értékeinek meghatározása. A vegyületek hatásának pontosabb jellemzéséhez a vegyületek koncentráció függésére, IC₅₀ értékeinek meghatározására volt szükség. A mérendő anyagokat háromszoros lépéseket (ugrásokat) alkalmazó hígítási sorban vizsgáltuk. Minden mérőtálca hetedik oszlopában feltettük az ATC0175 referencia vegyület hígítási sorát is, amivel a mérések megbízhatóságát ellenőriztük. A mérésekre jellemző Z', S/B adatok és az ATC0175 meghatározott IC₅₀ értékei azt mutatták, hogy a mérés megbízhatóan működött.

középső érték 90 ill. 95%-os eloszlási intervallumát).

A hasonlósági kereséssel kapott analóg könyvtár a referencia vegyületekre készített tulajdonság (paraméter) tér figyelembevételével szűrtük (célszerűen az összes (6) paraméter teret együttesen alkalmaztuk, azaz mindegyik intervallumba esést egyenlő súllyal vettük figyelembe).

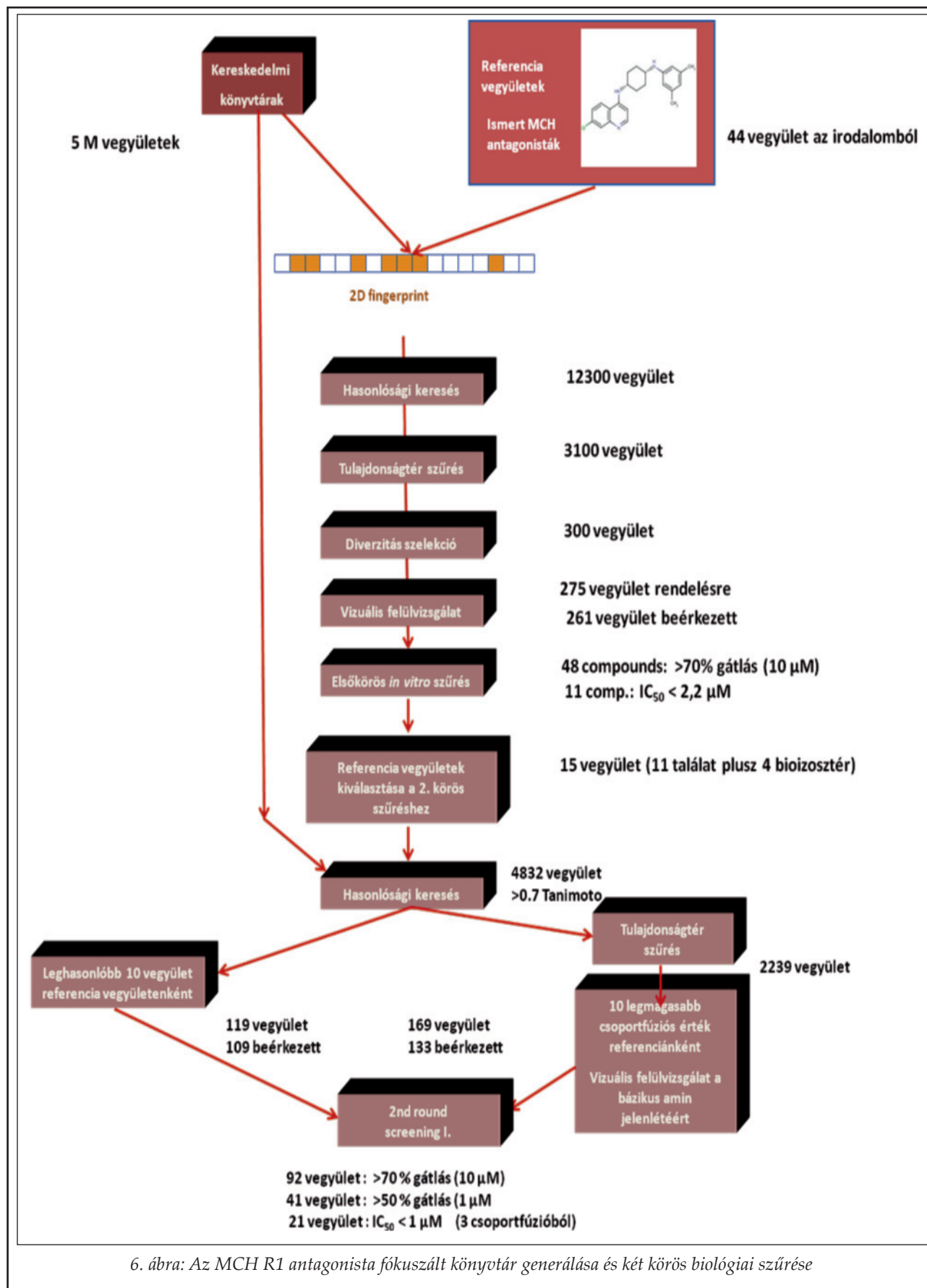
Az így kapott szűkített halmazból diverzitás szelekcióval egy 300 vegyületből álló végső könyvtár generáltunk, amiből vizuális analízissel kivettük a kémiai és szintetikus „nonszensz” vegyületeket (6. ábra).

Az *in silico* válogatás eredményeként egy 271 darab vegyületből álló fókuszált könyvtár állítottunk össze és végül 261 anyagot rendeltünk

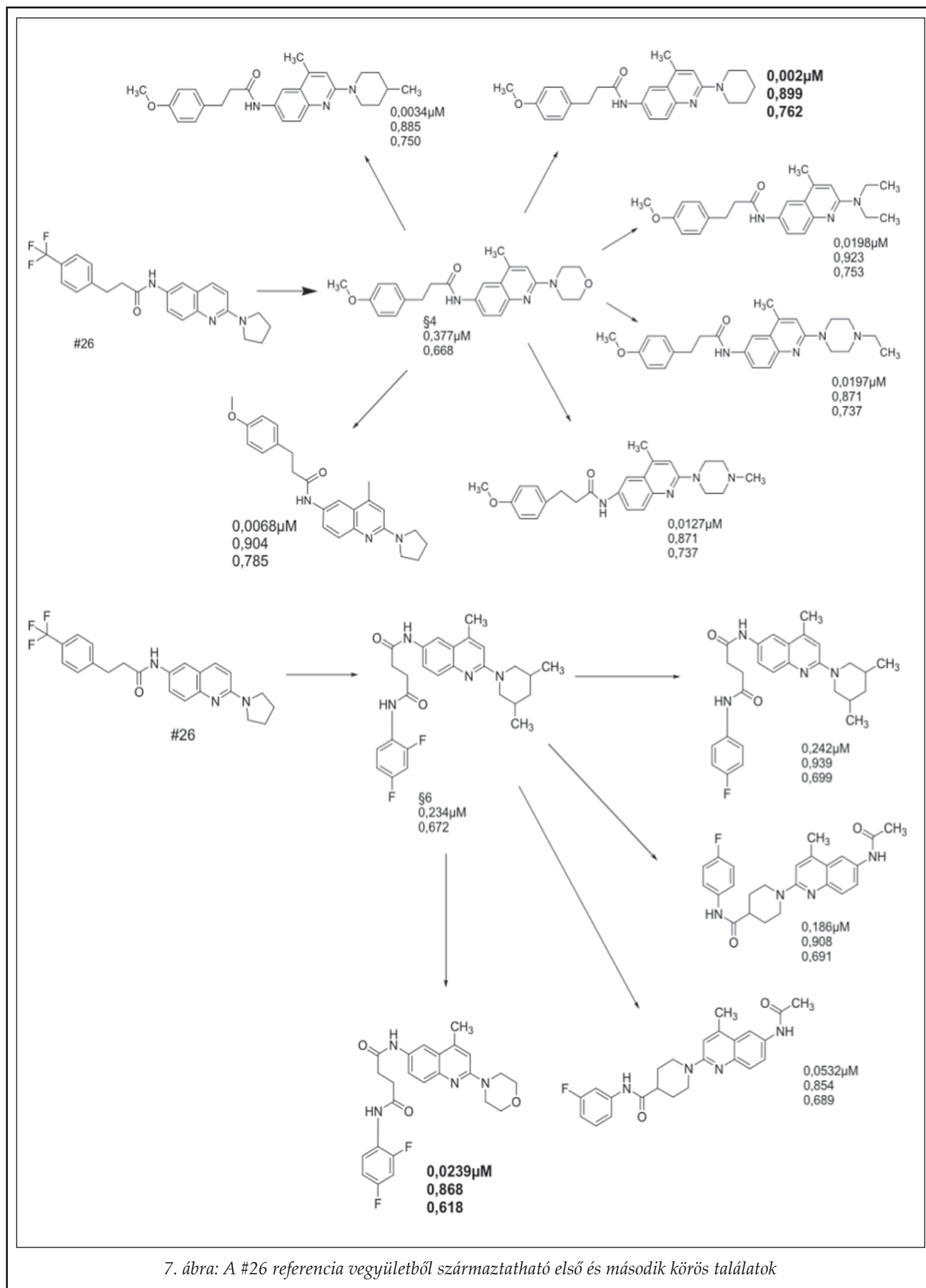
A dózishatás görbékből a találatokra meghatározott legaktívabb vegyületek (antagonista aktivitás kisebb, mint 2,5 μM koncentráció) IC₅₀ értékeit a II. táblázat tartalmazza. Az eredmények a mérés reprodukálhatóságát is bizonyították, mert csak egyetlen olyan anyagot választottunk az egy pontos szűrés alapján, ami teljesen hatástalan volt az IC₅₀ meghatározás során.

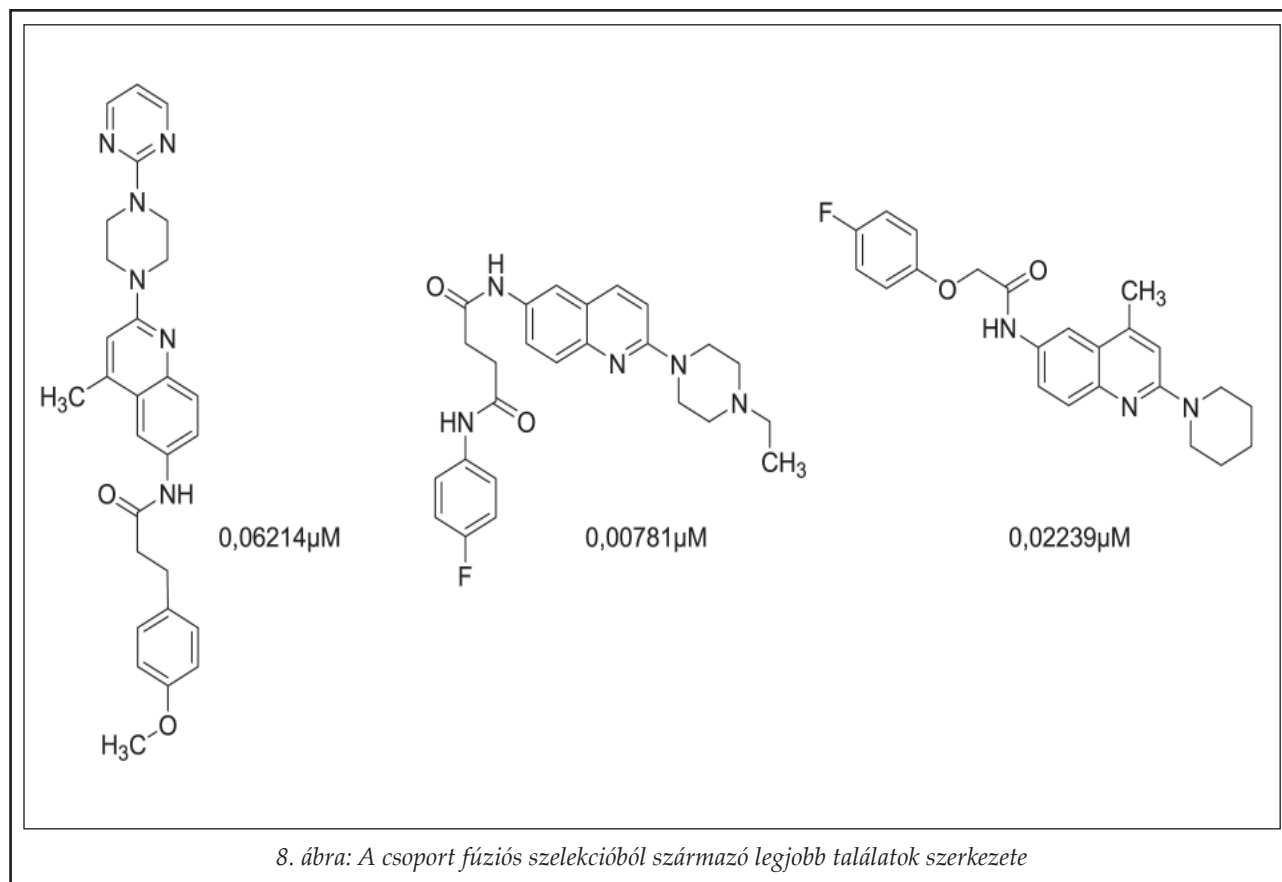
**Elsőkörös aktív találatok
(‘hit vegyületek’) szerkezeti analógjainak
kiválasztása 2D hasonlósági kereséssel
kereskedelmi adatbázisokból
a 2. körös szűrésre**

A második körös hasonlósági keresésre azt a 11



6. ábra: Az MCH R1 antagonisták fókuszált könyvtár generálása és két körös biológiai szűrése





vegyületet választottunk ki, melyek IC_{50} értéke 2,2 μM alatt volt.

A #9-es vegyület a #8-as vegyület variánsa, míg a #13, #14, és #15 vegyületek #12-es vegyület bioisztér analógjai ill. bázikus aminra cserélt variánsai (a többi vegyületnél az IC_{50} értékek fel vannak tüntetve).

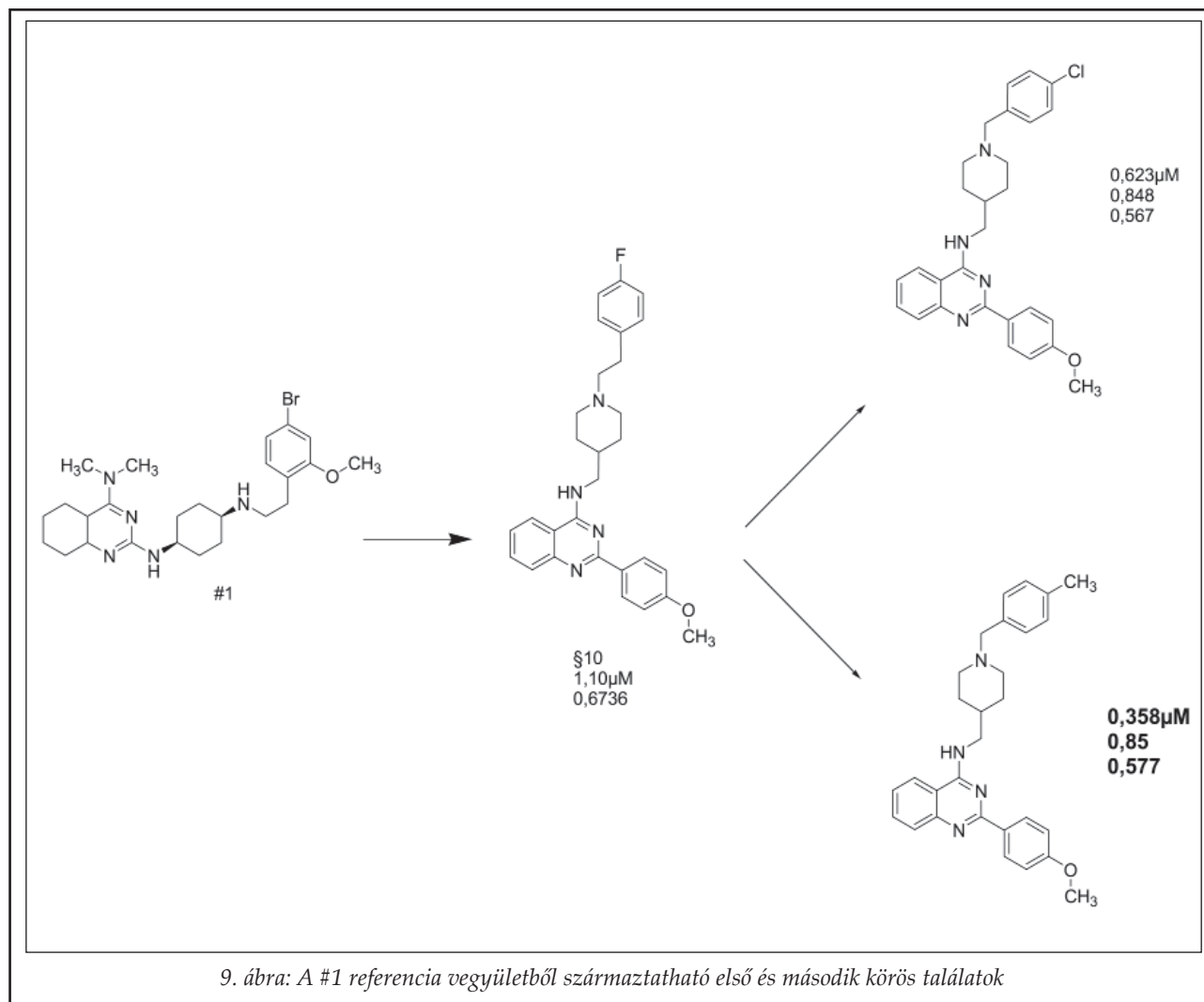
A 15 első körös referencia vegyület szerkezetéből kiinduló 2D hasonlósági keresést beszállító adatbázisokon végeztük el, mint az elsőkörös fókuszált könyvtár esetén. A hasonlósági keresést elvégezve Tanimoto > 0,70 hasonlósággal 4832 vegyületet azonosítottunk (6. ábra), majd referencia vegyületenként közelítőleg legjobb 10 vegyületet választottuk ki (összesen 119 vegyület). Ez esetben a vegyületek tulajdonság terét nem vettük figyelembe. Ez a 119 vegyület jelentette a hasonlósági keresés egyik fontos csoportját (hózzávetőlegesen felét).

Annak érdekében, hogy olyan analógokat találjunk, amelyek az első körös találatokban gyakrabban előforduló szerkezeti motívumokat lehetőleg egyetlen molekulában egyesítve tartalmazzák, alkalmaztuk az ún. csoport fúziós (group fusion) módszert [13]. Ennek az a lényege, hogy a 15 hitvegyü-

letre külön-külön elvégeztük a hasonlósági keresést egy adott vegyülethalmazra, majd az adott vegyületre kapott hasonlósági értékeket (Tanimoto koefficiens) összeadtuk és így kaptunk egy kumulált, ún. csoport fúziós értéket (group fusion score-t). Világos, hogy feltehetőleg a legnagyobb csoport fúziós értéket eredményező vegyületek tartalmaznak nagyobb számban olyan szerkezeti motívumokat, melyek több különböző referencia vegyületről származhatnak és azokat egyetlen molekulában egyesítik, akár új fragmens elrendezést ill. kemotípust eredményezve.

Annak érdekében, hogy a számításokban szereplő vegyületszámot csökkentsük a 0,7-es Tanimoto esetén kapott 4832-es halmazt az eredeti irodalmi referencia vegyületek tulajdonság terének (I. táblázat) központi 90 %-át figyelembe véve 2239-re csökkentettük és a csoport fúziós többszörös hasonlósági keresést ezen a kisebb halmazon hajtottuk végre.

A vegyületeket a csoport fúziós csökkenő értékek szerint rendeztük és megállapítottuk, hogy az első 130 vegyület a 15 első körös referencia vegyület közül csak 3-ból származik. A referencia vegyületek jobb reprezentálhatósága érdekében a szelekciós stratégiát úgy módosítottuk, hogy min-



den referencia vegyületet külön vizsgáltunk. Azaz az adott referencia vegyületre vonatkoztatott egyedi hasonlósági érték és a csoport fúziós érték nagyságát figyelembe véve 10-13 optimális értékű vegyületet választottunk vizuális analízissel. Az így nyert halmazból a bázikus N-t nem tartalmazókat kivettük (kivéve a #12#-15-nél, mert ott a hit/seed sem tartalmazott bázikus N -t).

A legnagyobb hasonlóságú (119) és a csoport fúzió figyelembe vételével nyert (169) vegyületet egyesítettük és beszállítók szerint rendeztük. A redundáns (több vendornál is előforduló) szerkezeteket kivettük és így 246 vegyületet rendeltünk meg 2. körös *in vitro* biológiai szűrésre.

2. körös vegyületek *in vitro* szűrése

A 242 beérkezett antagonistát jelölt előszűrésére egy-pontos mérést alkalmaztunk és ez az első körös mérésekkel analóg módon történt.

A 242 vegyületből 92 bizonyult hatásosnak 10 μM -ban a 30%-os definíció (maradék aktivitás) alapján, ezért a hatásosabb vegyületek kiválasztására egy újabb egyponstos szűrést végeztünk, ahol az antagonisták koncentrációja 1 μM volt. Ezekből azokat a vegyületeket választottuk ki IC_{50} mérésre, amelyeknél a maradék aktivitás kisebb volt, mint 50%.

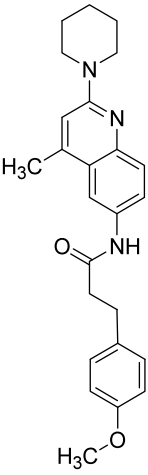
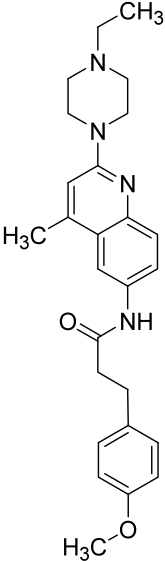
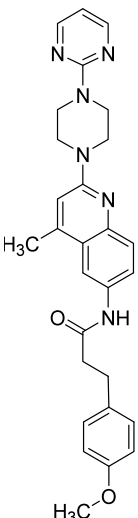
Az egyponstos mérések alapján kiválasztott 41 vegyület hatásának koncentráció függése alapján a vegyületek IC_{50} értékeit határoztuk meg az első körös *in vitro* szűréssel analóg módon. A kiválasztott vegyületek közül 5 db-nak az IC_{50} értéke volt 2 μM -nál nagyobb, 17 vegyület 500 nM-nál kisebb (III. táblázat) és ezek közül 11 vegyület esetén mértünk 100 nM-nál kisebb értéket.

MCH antagonisták hit vegyületek szerkezeti elemzése

Különösen érdekes nyomon követni, hogy a 2D

17 második körös találat,
amely 500 nM-nál kisebb koncentrációban volt aktív

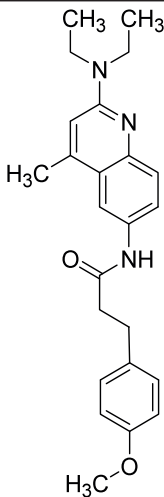
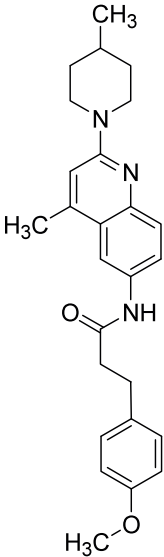
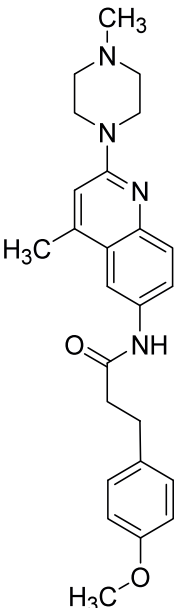
III. táblázat hasonlósági keresés során milyen szerkezeti módosulásokon mentek keresztül a molekulák, különösen a biológiai aktivitás javulásának fényében.

Sor-szám	Szerkezet	Referencia id	IC ₅₀ (μM)
1		4	0,002
2		4	0,0197
3		4	0,0621

Az alábbiakban az első és második körös találatok (hit vegyületek) szerkezeti evolúcióján keresztül mutatjuk be, hogy a referencia vegyületekből kiindulva milyen szerkezeti módosítások vezettek a leghatékonyabb vegyületekhez. (A szerkezeteknél legfelül az IC₅₀ érték, majd az első körös hithez való hasonlóság, illetve legalul a kiindulási referencia vegyülethez való hasonlóság van feltüntetve.)

A 7. ábrán látható, hogy a #26-os referencia vegyületből származó két első körös hit vegyület (§4 és §6) biológiai aktivitását 9 db 2. körös hit esetében sikerült megjavítani. A §4-ből származtatható 6 aktív vegyület között 2 nM-os vegyületet is sikerült azonosítani. Mind a 6 vegyület megtartotta a kiindulási illetve az eredeti referencia kemotípust és a főbb fragmens elrendezést is. Mivel a találatok szerkezete elég közeli hasonlóságban áll a referencia vegyülettel, a kapott aktivitások ezen mérések egyben az esszét is validálják. A §6-os hitből eredő 2. körös találatok közül 2 az amino-kinolint más fragmens elrendezésben tartalmazza és ezt akár új

Folytatás az előző oldalról

Sor-szám	Szerkezet	Referencia id	IC ₅₀ (μM)
4		4	0,0198
5		4	0,0034
6		4	0,0127

kemotípusnak is tekint-
hetjük, mint pl. a jobb
alsó sarokban található
két molekula (IC₅₀ = 186
ill. 53 nM).

A „csoport fúziós”
szelekcióból származó
legjobb találatok ugyan-
csak a #26-os referencia
vegyületből származtat-
ható kemotípusra ve-
zethetők vissza, ami
annak tulajdonítható,
hogy a csoport fúziós
értékben a #26-os refe-
renciahoz kapcsolható
kemotípushoz való kö-
zeli hasonlóság képvise-
lte a legmagasabb
Tanimoto értéket. A cso-
port fúziós szelekcióból
a legjobb találat biológiai
aktivitása 7,8 nM volt
(8. ábra).

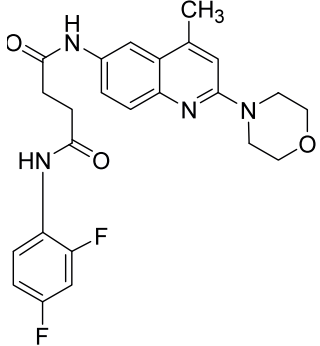
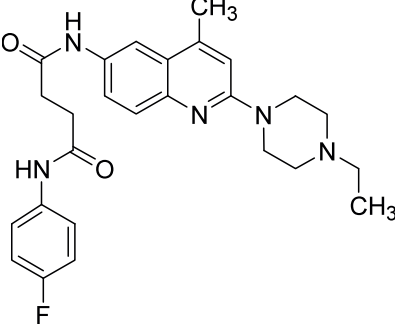
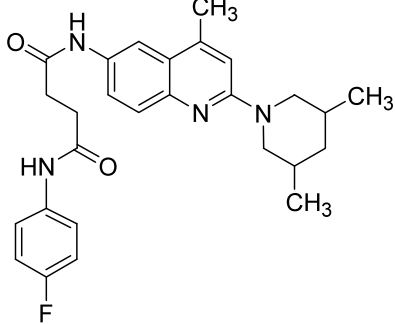
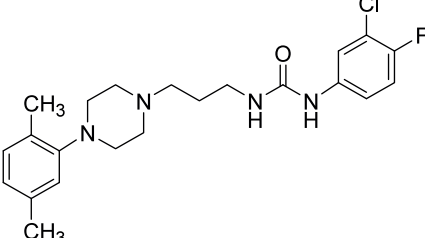
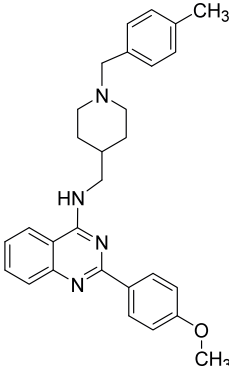
A 9. ábrán látható,
hogy a #1-es referencia
vegyületből származó
első körös hit vegyület
(§10) szubsztituens min-
tázata jelentősen eltér a
referencia vegyületétől,
bár a heterociklusos
gyűrű azonos maradt.
Az első körös hit köze-
pes biológia aktivitását
2 db 2. körös hit eseté-
ben sikerült megjavíta-
ni, fenntartva ezt a mó-
dosított szubsztituens el-
rendezést. A legjobb ta-
lálat IC₅₀ értéke: 358 nM,
ami jelentős javulás.

Összefoglalás

A 2. körös biológiai szű-
rés eredményeit és az
eredmények kemotípu-
sonkénti megoszlását
valamint az elért találati
arányt („hit rate”) a IV.
táblázat foglalja össze.
Eszerint 4 kemotípusnál

A táblázat folytatása a következő oldalon

Folytatás az előző oldalról

Sor-szám	Szerkezet	Referencia id	IC ₅₀ (μM)
7		6	0,0239
8		6	0,0078
9		6	0,242
10		7	0,370
11		10	0,358

kaptunk 500 nM-nál kisebb koncentrációban antagonistázó (aktív) vegyületet, bár a #26-os eredeti referencia vegyület kemotípusa láthatóan dominál.

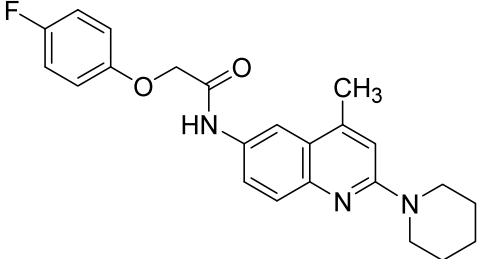
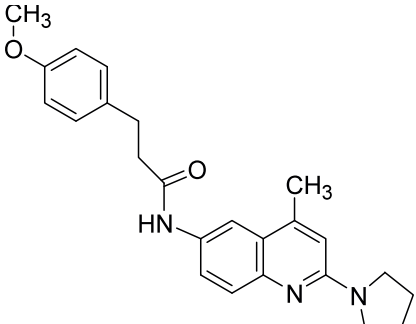
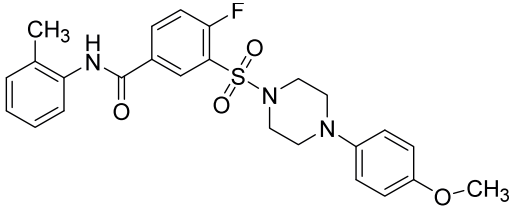
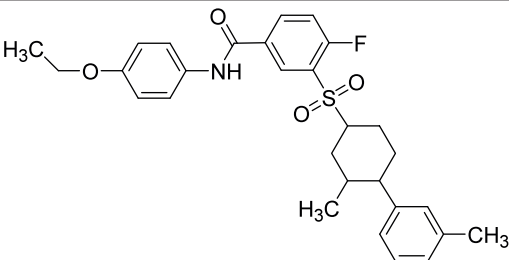
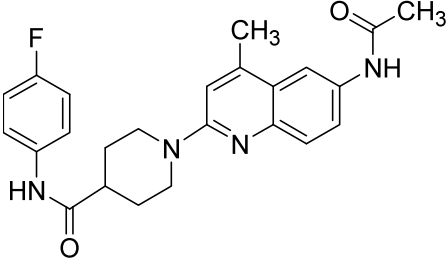
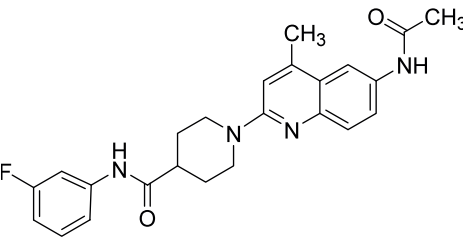
Az V. táblázatban látható, hogy a 2. körben azonosított 41 hit vegyület közül 46% aktivitása jobb volt, mint az első körös hitek, amelyekből származtatható.

Összefoglalva, a 2. körös találatok, bár nem hoztak fel lényeges új kemotípusokat (legfeljebb variánsokat), mégis jelentős mértékben javították a biológiai aktivitást (46%), még ha ugyanabban a szerkezeti körben is. A fókuszált könyvtár 2D hasonlósági keresésén alapuló stratégiája alkalmas gyors, hatékony vegyület kiválasztásra több milliós könyvtárakból pl. új biológiai esszé beállításakor és széleskörű validálásakor. Jelenleg rendelkezésre állnak kiegészítő módszerek, amelyek a kemotípus vagy molekuláris váz megváltoztatását („scaffold hopping [17]”) lehetővé teszik új kemotípusok felfedezését eredményezve.

A két körös fókuszált könyvtár biológiai szűrése hatékonyságát azal is demonstrálhatjuk, hogy míg az első körös szűrés során 261 vegyületből 5 mutatott 1 μM alatti antagonistázó aktivitást (1,9%-os találati arány), míg a második

A táblázat folytatása a következő oldalon

Folytatás az előző oldalról

Sor-szám	Szerkezet	Referencia id	IC ₅₀ (μM)
12		4	0,0224
13		4	0,0068
14		11	0,463
15		11	0,490
16		6	0,186
17		6	0,0532

körös szűrésben 21 vegyületet azonosítottunk a 242 mérésre beérkezett vegyületből, amelyek szintén 1 μM koncentráció alatt antagonizálták a biológiai célpont, MCH-t (8,6 %-os találati arány).

Köszönetnyilvánítás

A jelen munka részben a Nemzeti Fejlesztési Ügynökség támogatásával valósult meg. (#KMOP-1.1.1-09/1-2009-0051)

IRODALOM

- Cheon, H.G.: Handb Exp Pharmacol 209, 383 (2012)
- Decornez, H., Gulyás-Forró, A., Papp, A., Szabó, M., Sármai, G., Hajdú, I., Cseh, S., Dormán, G., Kitchen, D.B.: ChemMedChem. 4(8), 1273 (2009)
- Edwards, B. S., Bologa, C., Young, S. M., Balakin, K. V., Prossnitz E.R., Savchuck N.P., Sklar L.A., Oprea T.I.: Mol. Pharmacol., 68, 1301 (2005)
- Keserű, Gy. M.: Magyar Kémiai Folyóirat - Összefoglaló közlemények 159, (2005)
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J.: Adv. Drug Deliv. Rev. 23, 3, (1997)
- Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H-Y, Smith, B. R., Wardm, K. W., and Kenneth, D. K.: J. Med. Chem., 45, 2615 (2002)
- Chaki, S., Funakoshi, T., Hirota-Okuno, S., Nishiguchi, M., Shimazaki, T., Iijima, M., Grottick, A. J., Kanuma, K., Omodera, K., Sekiguchi, Y., Okuyama, S., Tran, T. A., Semple, G., Thomsen, W. J.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 313, 831. (2005)

IV. táblázat

A 2. körös virtuális és in vitro biológiai szűrés találati arányai az antagonisták aktivitás mértékében

Referencia	Első körös találat	IC ₅₀ μM	2. körös találatok száma (< 2 μM)	2. körös találatok száma (< 500 nM)	2. körös találatok száma (< 100 nM)	Legjobb 2. körös találat (IC ₅₀) μM
#26	§4	0,377	6	6	6	0,002
#26	§6	0,233	4	4	2	0,0239
#22	§11	0,485	2	2		0,462
#1	§10	0,676	2	1		0,577
#41	§8	2,2	1			0,749
#37	§7	1,52	5	1		0,884
#33	§3	1,82	2			1,19
#26	csoportfúzió		8	3	3	
Találati arány			11,20%	7%	4%	

V. táblázat

A két körös fókuszált könyvtár biológiai szűrése hatékonyságának szemléltetése

Találatok szintje	Találatok száma	% arány	
sokkal jobb, mint az első körös hit, amiből származtatható	13	31,71	46,34
valamivel jobb, mint az első körös hit, amiből származtatható	6	14,63	
azonos aktivitású, mint az első körös hit, amiből származtatható	16	39,02	
rosszabb aktivitású, mint az első körös hit, amiből származtatható	6	14,63	
	41		

8. David, D. J., Klemenhausen, K. C., Holick, K. A., Saxe, M. D., Mendez, I., Santarelli, L., Craig, D. A., Zhong, H., Swanson, C. J., Hegde, L. G., Ping, X. I., Dong, D., Marzabadi, M. R., Gerald, C. P., and Hen, R.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 321: 237-248, (2007)
9. Tovar, A., Eckert H., Bajorath, J.: ChemMedChem 2, 208, (2007)
10. Willett, P., Winterman, V.: Quant. Struct. Act. Rel. 5, 18 (1986)
11. Adams, S. E., Glen, R. C.: QSAR Comb. Sci. 26, 1133 (2006)
12. Xue, L., Stahura, F. L., Godden, J.W., Bajorath, J.: J. Chem. Inf. Comput. Sci. 41, 746 (2001)
13. Hert, J., Willett, P., Wilton, D. J., Acklin, P., Azzaoui, K., Jacoby, E., Schuffenhauer, A.: J. Med Chem 48, 7049 (2005)
14. Irwin, J. J., Shoichet, B. K.: J. Chem. Inf. Model. 45, 177 (2005)
15. Goodnow, R., Gillespie, P.: Progr Med Chem 45, 1, (2007)
16. Morphy, R.: J. Med. Chem. 49, 2969 (2006)
17. Sun, H., Tawa, G., Wallqvist, A.: Drug Discov. Today. 310, (2012)

Érkezett: 2013. július 8.

***Mycobacterium tuberculosis* ellenes hatóanyagok fejlesztése és szerkezet-hatás összefüggéseinek vizsgálata**

BASKA FERENC^{a,d}, SZÉKELY EDINA RITA^d, SZÁNTAI-KIS CSABA^d, BÁNHEGYI PÉTER^d,
HEGYMEGI-BARAKONYI BÁLINT^d, NÉMETH GÁBOR^d, BREZA NÓRA^d, ZSÁKAI LILIAN^{b,d},
GREFF ZOLTÁN^d, PATÓ JÁNOS^d, KÉRI GYÖRGY^{a,b,d}, ÓRFI LÁSZLÓ^{a,c,d,*}

^aRacionális Hatóanyagtervező Laboratóriumok, Kooperációs Kutatóközpont, Semmelweis Egyetem

^bOrvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet, Semmelweis Egyetem

^cGyógyszerészeti Kémiai Intézet, Semmelweis Egyetem

^dVichem Chemie Kutató Kft.,

* Levelező szerző: orfi.laszlo@pharma.semmelweis-univ.hu

Summary

Baska, F., Székely, E.R., Szántai-Kis, Cs., Bánhegyi, P., Hegymegi-Barakonyi, B., Németh, G., Breza, N., Zsákai, L., Greff, Z., Pató, J., Kéri, Gy., Órfi, L.: **Development and Structure-Activity Relationship Studies of Inhibitors Against *Mycobacterium tuberculosis*.**

Tuberculosis is considered to be one of the major health problem not only in the less developed countries but in the economically developed countries as well. Roughly one third of the world's population are infected with *Mycobacterium tuberculosis* and a significant part of them are carriers of latent tuberculosis. From ten percent of these latent infections are developing the active TB disease and fifty percent of them die from the illness without appropriate treatment. The drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB, XDR-TB) and TB-HIV co-infection attracted attention to the most serious infectious disease. Inhibition of alternative signaling pathways were an important part of the research strategies for cancer and inflammatory diseases in recent years. In case of *Mycobacterium tuberculosis* such pathways were also identified, for example, three serine-threonine kinases (PknA, PknB, PknG) which are necessary and essential for bacterial growth. In this paper we summarize our best anti-TB active compounds, their biological effects and structure-activity relationships using in silico modeling, biochemical measurements and tests on active bacteria.

Keywords: H37Rv, kinase assay, molecular modeling, Pkn kinases, tuberculosis

Összefoglalás

A tuberkulózis nemcsak a fejlődő országokban számít az egyik legnagyobb egészségügyi problémának, hanem a gazdaságilag fejlett országokban is komoly gondokat okoz. A világ népességének durván egyharmada *Mycobacterium tuberculosis*-sal, a humán TBC kórokozójával fertőzött, és ennek jelentős része látens formában van jelen. A látens fertőzöttek 10 százalékánál alakul ki a betegség, és a megfelelő kezelés hiányában 50 százalékuk a tuberkulózis áldozatává válik. A gyógyszer-rezisztens *Mycobacterium tuberculosis* törzsek (MDR-TB, XDR-TB) megjelenése és a TB-HIV együttes problémája ismét felhívta a figyelmet a legsúlyosabb fertőző betegségekre. Az alternatív jelátviteli útvonalak gátlása tumoros illetve gyulladásos megbetegedések esetén már fontos részét képezi a kutatási stratégiáknak. A *Mycobacterium tuberculosis* esetében is azonosítottak három szerin-treonin kinázt (PknA, PknB, PknG), melyek működése bizonyítottan szükséges a baktérium növekedéséhez. Közleményünkben összefoglaljuk a legjobb hatású TBC ellenes vegyületeinket, a szerkezet-hatás összefüggések alapján előállított molekulák biológiai hatását, az in silico modellezéstől kezdve a biokémiai méréseken keresztül egészen a baktériumtörzseken történő vizsgálatig.

Kulcsszavak: H37Rv, kináz assay, molekulamodellezés, Pkn kinázok, tuberkulózis

Bevezetés

A *Mycobacterium tuberculosis* fertőzés általi halálesetek száma elérte az 1,4 milliót a WHO 2012-es jelentése szerint [1]. Mivel a *M. tuberculosis* komplex életciklussal rendelkezik, és képes a makrofágokban túlélni, a látens fertőzések hosszú ideig nyugvó állapotban vannak, mielőtt aktív betegséggé alakulnak át. Ezek a látens fertőzések kiemelt egészségügyi veszélyforrást jelentenek,

akárcsak a gyógyszer-rezisztens törzsek megjelenése [2-4]. Az utóbbi tíz évben a gyógyszerkutatási stratégiák fő részét képezte az ún. célpont alapú gyógyszertervezés, mivel az eukariótákhoz hasonlóan a prokarióták esetén is léteznek kinázok által szabályozott jelátviteli útvonalak [5]. A *M. tuberculosis* esetén tizenegy szerin/treonin kinázt azonosítottak, melyek közül három (PknA, PknB, PknG) kiemelt szerepet tölt be a baktérium növekedésében és túlélésében [6-8]. Funkciójukat te-

kintve a PknG szerepe a leginkább tisztázott. A PknG kináz megakadályozza a fagoszómalizoszóma fúzióját, ezáltal a bekebelezett baktérium elkerüli a makrofágon belüli lebontó folyamatokat. A PknG gátlása a baktérium degradációjához vezet [9]. A PknA és PknB kinázok a baktérium osztódásában játszanak szerepet és a gének átíródásának növekedését figyelték meg a makrofágok fertőzése során [10, 11]. A PknB kináz esetén igazolást nyert még a baktérium növekedésében betöltött fontos szerepe is [12].

Potenciális új célpontok a *M. tuberculosis* esetén a NAD kináz, valamint a NAD szintetáz is. A NAD kináz katalizálja a NAD foszforilációját ATP jelenlétében [13], és az enzim esszenciális a *Mycobacterium* növekedéséhez, még a gyógyszerrezisztens törzsek (multidrug-resistant) esetén is [14]. A NAD szintetáz dezamido-NAD⁺-ból állít elő NAD⁺-ot ATP és ammónia jelenlétében [15], és szintén a növekedésben játszik kiemelkedő szerepet, tehát potenciális célpontként kezelhető [16].

Munkánk során célul tűztük ki vegyülettárunk virtuális szűrését PknB és PknG kinázok ellen, valamint egy korábbi szűrés során kiválasztott 50 molekula tesztelését NAD szintetázon *in vitro* biokémiai rendszeren és H37Rv aktív baktériumtörzsön. Közleményünkkel kutatócsoportunk eddigi munkáját és eredményeit kívánjuk összefoglalni.

Anyagok és módszerek

Vegyületek

A vizsgálatokhoz felhasznált vegyületek a Vichem Chemie Kft. (Budapest, Magyarország) kinázgátló vegyülettárából származnak (Nested Chemical LibraryTM).

In silico kötődés modellezés PknG kinázon

A molekulamodellezéshez és a kötődések vizsgálatához a Schrödinger Suite 2009-es verzióját használtuk. Felhasznált modulok: Maestro, LigPrep, Glide, Protein Preparation Wizard és QikProp.

A PknG kristályszerkezetét a Protein Data Bank adatbázisból töltöttük le (PDB ID: 2PZI), majd a Protein Preparation Wizard modul segítségével készítettük elő a fehérjét a dokkoláshoz: eltávolítottuk az ATP-kötőhely közelében található vízmolekulákat illetve hozzárendeltük az aminosavakhoz a szerkezetből hiányzó hidrogén-atomokat. A vegyülettárból származó molekulák 3D

szerkezetét a LigPrep modul segítségével határoztuk meg 7,4-es pH-n, OPLS_2005 erőteret alkalmazva. A receptor modellezéséhez és a dokkoláshoz a Glide modult használtuk.

PknB, PknG biokémiai assay vizsgálatok

A radioaktív PknB kináz enzim assay-t a kutatócsoportunk által korábban publikált módon végeztük el [γ -³³P]ATP-t használva [17]. Szubsztrátként GarA peptidet alkalmaztunk.

A PknG kináz enzim assay-t 384 lyukú mikrolemezen (Corning 3676) 10 μ l térfogatban végeztük el BellBrook Labs Transcreeper[®] ADP FP Assay kit rendszerrel.

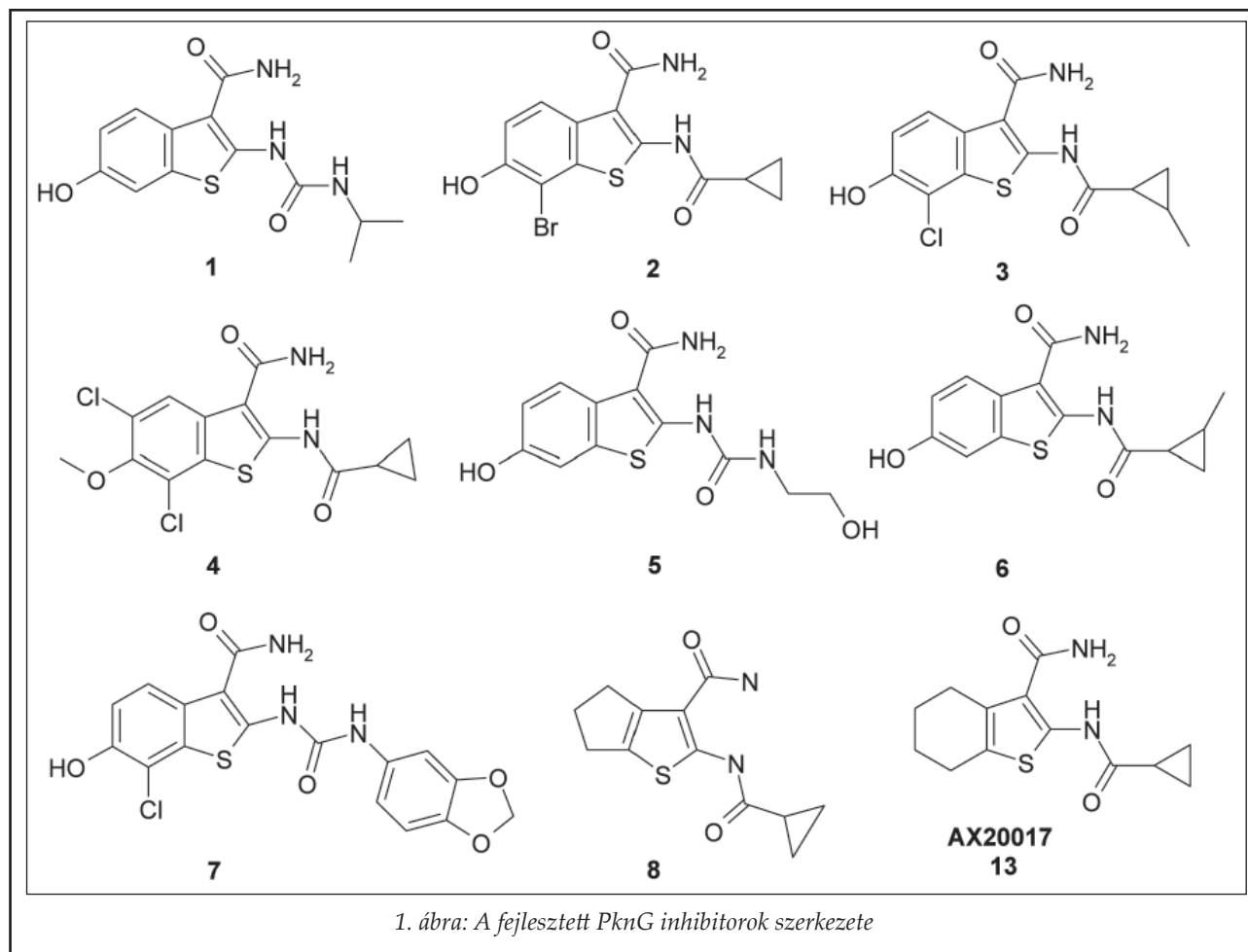
A felhasznált assay puffer: 20 mM MOPS (3-(N-morfolin)propánszulfonsav) 7,5-ös pH-jú oldata, 1 mM DTT (ditiotritol), 0,5 mM MnCl₂, 0,01 térfogatszázalékos Brij35 detergens és 5 térfogatszázalékos glicerin. Szubsztrátként ez esetben is GarA enzim specifikus peptidet használtunk (0,075 mg/ml) az ATP mellett. Az ATP koncentrációját a látszólagos KmATP értéknek megfelelően állítottuk be (10 μ M). Az enzimreakciót 60 percig inkubáltuk, majd 10 μ l TranScreenerTM Stop and Detection oldatot adtunk hozzá. Ez az oldat PknG kináz esetén 20 mM HEPES (4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etánszulfonsav) pH = 7,5 puffert, 40 mM EDTA kelátképzőt, 0,02 V/V% Brij35 detergenst, 11,80 μ g/mL ADP2 Ab-t valamint 2 nM ADP Alexa633 Tracer oldatot tartalmazott. Analyst GT készüléken mértük a fluoreszcencia polarizációt.

NAD szintetáz Assay

A NAD szintetáz assay vizsgálatokat egy korábbi publikációban leírtak szerint végeztük el [18].

Fertőzött makrofágokon történő vizsgálatok

A THP-1 sejtvonalat differenciáltuk 20 ng/ml forbol-12-mirisztát-13-acetáttal (PMA), majd egy éjszakán át növesztettük 10% FBS (Fetal Bovine Serum) és 1 % glutamin tartalmú RPMI oldatban 37 °C-on, 5% szén-dioxid jelenlétében. A makrofágokat 2 órán keresztül fertőztük humán szérummal kezelt *M. bovis* BCG-vel (10 baktérium/sejt), majd friss médiummal mostuk és a 100 μ g/ml gentamicinnel elöltük a fagocitózist elkerülő baktériumokat. A fertőzött makrofágokat 10 μ M végkoncentrációjú inhibitorral inkubáltuk 24, valamint 48 órán keresztül. A mérés előtt antibiotikum



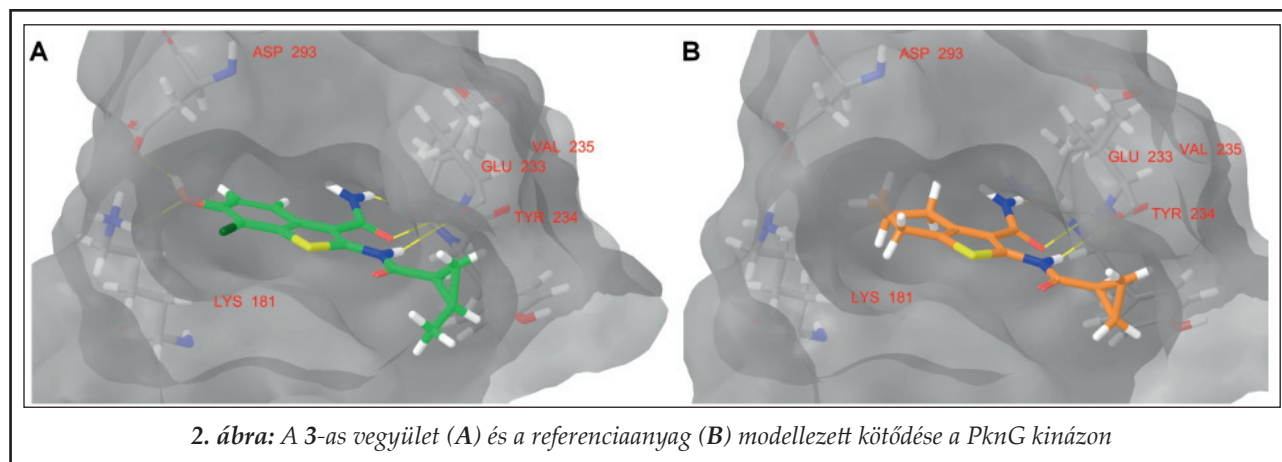
mentes médiumra cseréltük az eredeti médiumot, és a begyűjtött makrofágokat meleg PBS oldattal mostuk. A telepszámot (CFU = colony forming

units) 7H10 lemezekén határoztuk meg, 10 % OADC (Oleic Acid Albumin Dextrose Complex) felhasználása mellett.

I. táblázat

A benzo[c]tiofén alapvázú vegyületek hatása PknB és PknG kinázokon.
Az IC₅₀ értékeket a 75%-os gátlóértékek alatt nem határoztuk meg.

Vegyület	Docking score (kcal/mol) on PknG	PknG %-os gátlás 10 μM-ban	PknG IC ₅₀ (μM)	PknB %-os gátlás 10 μM-ban	PknB IC ₅₀ (μM)
1	-8,957	98	0,03	7	ND
2	-8,639	98	0,02	54	ND
3	-9,272	96	0,02	22	ND
4	-8,069	99	0,04	8	ND
5	-9,185	98	0,05	80	3,85
6	-8,944	98	0,05	18	ND
7	-7,736	99	0,01	38	ND
8	-8,239	92	0,47	30	ND
9	-8,649	99	0,05	41	ND
10	-8,136	100	0,11	50	ND
11	-8,670	100	0,07	62	3,96
12	-8,770	99	0,02	57	ND
AX20017 (13)	-8,434	90	0,3	10	ND



II. táblázat

A fertőzött makrofágokon mért CFU gátló hatások 24 és 48 órás inkubációs időt követően

	Telepszám képződés %-os gátlása	
	24 óra	48 óra
Kontroll	0%	0%
1	0%	~55%
2	~50%	~80%
3	~10%	~55%
4	~30%	~42%
5	~10%	0%
6	~15%	~43%
7	~5%	~40%
AX20017 (13)	0%	~18%

H37Rv baktériumtörzsön történő vizsgálatok

A vegyületeket DMSO segítségével feloldottuk és hígítási sort készítettünk 10 µg/mL és 0,625 µg/mL között az erre a célra használatos mikrolemezen. A *M.tuberculosis* H37Rv baktériumtörzs szupenzióját hozzáadagoltuk minden egyes mikrolemezhez. A lemezeket lezártuk és 37 °C-on

inkubáltuk 5 napon keresztül. Ezt követően 0,01% rezaurint adtunk a szuszpenziókhoz és egy éjszakan keresztül 37 °C-on inkubáltuk. Referencia anyagként Isoniazidot (MIC érték ~ 0,1 µg/mL) használtunk.

Eredmények

PknG és PknB kinázgátlók vizsgálata

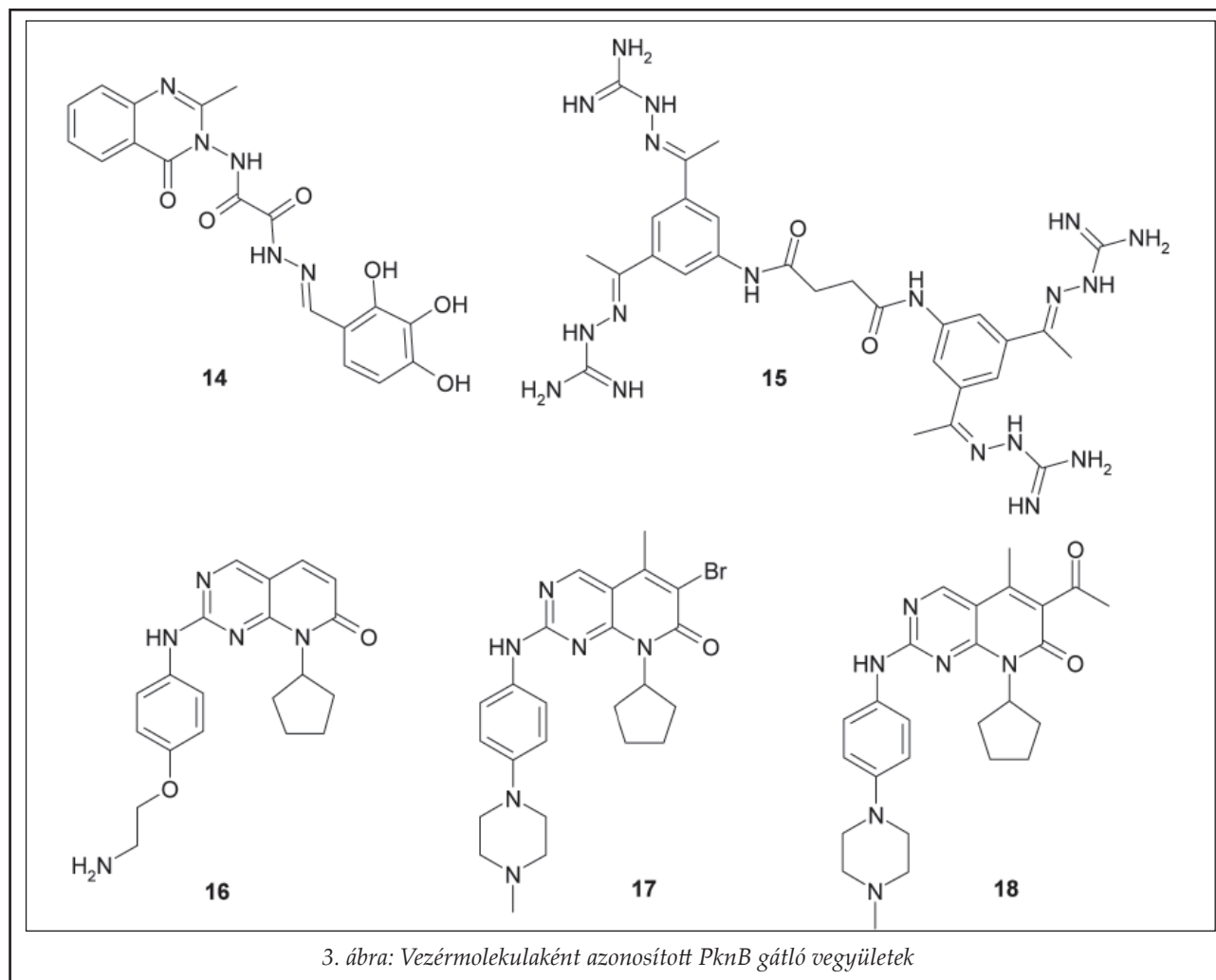
A virtuális szűrés során több mint 1000 vegyületet teszteltünk PknG fehérjén. A szűrés során kijött vezérmolekulákat biokémiai assay segítségével validáltuk. A mérések során azt találtuk, hogy a PknG enzim gátlása szinte mindig a benzo[c]tiofén vázhoz kötött, ezért optimalizálás céljából létrehoztunk egy vegyülettárat az azonosított vezérmolekulák köré. Az 1. ábrán a hét legígéretebb benzo[c]tiofén vegyület szerkezete szerepel.

A mérések során azt találtuk, hogy mindegyik egy nagyságrenddel jobb IC₅₀ értékkel rendelkezik (I. táblázat), mint a referenciaanyag AX20017 (13). A Schrödinger Suite-tal végzett dokkolások alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a gyűrű aromatizálása egy térben planáris biciklust hozott

III. táblázat

PknB gátló vegyületek in vitro biokémiai assay eredményei

Vegyület	PknB %-os gátlás 10 µM-ban	PknB IC ₅₀ (µM)	PknG %-os gátlás 10 µM-ban	PknG IC ₅₀ (µM)
14	91	0,337	39	ND
15	99	0,210	ND	ND
16	94	0,445	49	ND
17	98	0,129	75	3,0
18	92	0,688	43	ND
19	98	0,205	ND	ND
20	100	0,621	ND	ND
21	98	0,088	ND	ND



létre, mely kedvez a fenolos hidroxilcsoport és a receptor között kialakuló hidrogénhíd kölcsönhatás létrejöttének (2. ábra). A 2. ábrán látható, hogy míg a 3-as vegyület hidrogén híd kölcsönhatásba lép a receptor Asp293-as és Lys181-es aminosavjaival (A), a referenciavegyület esetén ez a kölcsönhatási lehetőség a szerkezetéből adódóan hiányzik (B). A hatás és a kötődés szempontjából a legfontosabb kritérium a tiofén gyűrű 2-es és 3-as helyzetében lévő amid csoportok megléte. Azoknál a vegyületeknél, ahol a 3-as helyzetű amid csoportot nitril csoporttal helyettesítettük, a hatás nagy mértékben csökkent, vagy teljesen elmaradt.

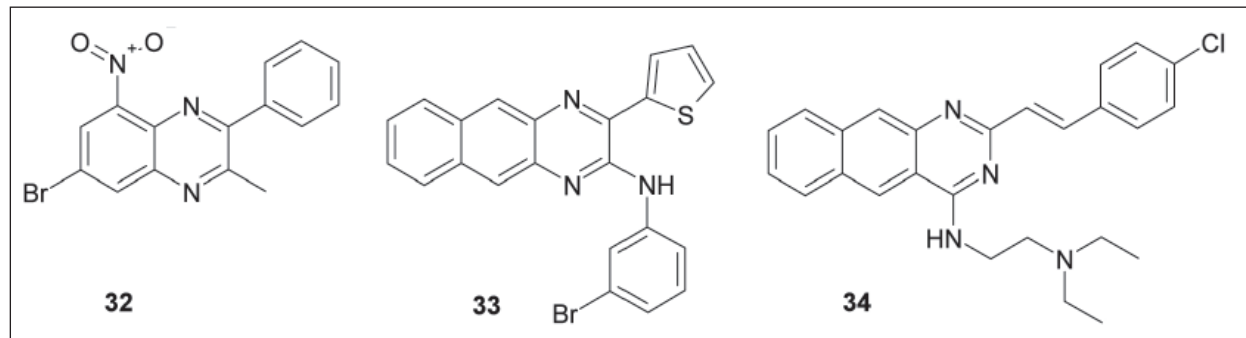
A ciklohexán gyűrű esetén a tagszám növelésével, majd csökkentésével próbálkoztunk. A növelés a hatást jelentősen, míg az egy metilénnel való csökkentés (8-as vegyület) csak minimális mértékben rontotta.

Vizsgáltuk a vegyületek hatását PknB kinázon is. A benzo[c]tiofének közül egyedül az 5-ös vegyület (1. ábra) mutatott 80%-os gátlást 10 μM -ban, IC_{50} értéknek 3,85 μM -t mértünk. A 11-es vegyület

mutatott még 62%-os gátlást (I. táblázat), ezért ellenőrzés céljából meghatároztuk ennek a vegyületnek is az IC_{50} értékét. Mivel a többi vegyület PknB gátlóértéke 50% körüli, illetve az alatt volt további IC_{50} meghatározásokat nem végeztünk.

IV. táblázat
A NAD szintetázon hatásos vezérmolekulák biokémiai eredményei

Vegyület	NAD szintetáz %-os gátlás 100 μM -ban	NAD szintetáz IC_{50} (μM)
22	75	67
23	100	50
24	100	50
25	98	55
26	77	67
27	82	64
28	90	60
29	76	62
30	85	55
31	87	63



4. ábra: H37Rv baktériumtörzsön hatékony vezérmolekulák

V. táblázat
Mért MIC értékek baktériumtörzsön

Vegyület	H37Rv MIC (μM)
32	3,10
33	~20,00
34	0,86
35	0,75
36	6,25
37	>100
38	>100
39	0,59
40	0,50
41	0,29

A PknG kináz a fagoszóma-lizoszóma fúzióját akadályozza meg, ezért a legjobb PknG gátló vegyületek közül hét származéknak (1-7) valamint a referenciaanyagnak (13) vizsgáltuk a hatását fertőzött makrofágokon. A vegyületek 10 μM-os koncentrációjú oldatait alkalmaztuk és 24 valamint 48 órás inkubációs időt követően mértük a viabilitást,

az ún. %-os CFU (colony forming units) gátló értékeket. A legtöbb vegyület hatékonynak bizonyult, főleg a 48 órás inkubációs időt követően volt szembevetendő a különbség (II. táblázat). A legígéretesebb molekulának a 2-es vegyület (1. ábra) tűnik, mely 80 %-ban gátolta a kolóniák kialakulását.

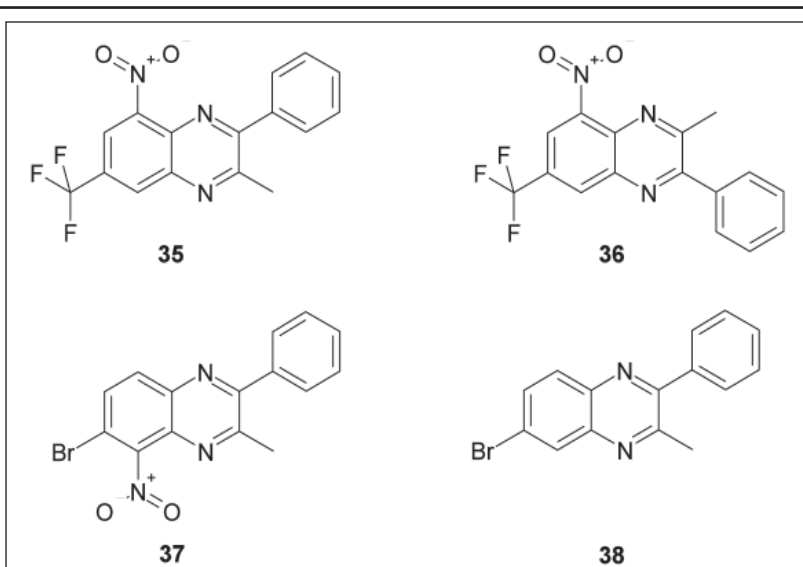
Mivel a benzo[c]tiofének szinte kivétel nélkül PknG kinázon voltak hatékonyak, ezért újabb virtuális szűrést követően kiválasztottunk 260 vegyületet biokémiai tesztelésre PknB kinázon. Sikertelenül azonosítani nyolc vegyületet (3. ábra), melyek nanomólos IC₅₀ értékkel (3. táblázat) gátolják a PknB kinázt.

Bár a vezérmolekulák szerkezete egymástól eltérő, az megállapítható, hogy a 14-es, 16-os, 17-es és 18-as vegyület méretéből és szerkezetéből adódóan ATP kompetitív inhibitora a PknB kináznak. A pontos hatásmechanizmus megállapítása céljából további optimalizálásra és szerkezet-hatás vizsgálatokra van még szükség, akárcsak a 15, 19, 20, 21 vegyületek esetén. Ezek a molekulák méretüket tekintve jóval nagyobbak az ATP kompetitív inhibitoroknál és közös szerkezeti elemük a bennük többszörösen megtalálható guanidin csoport.

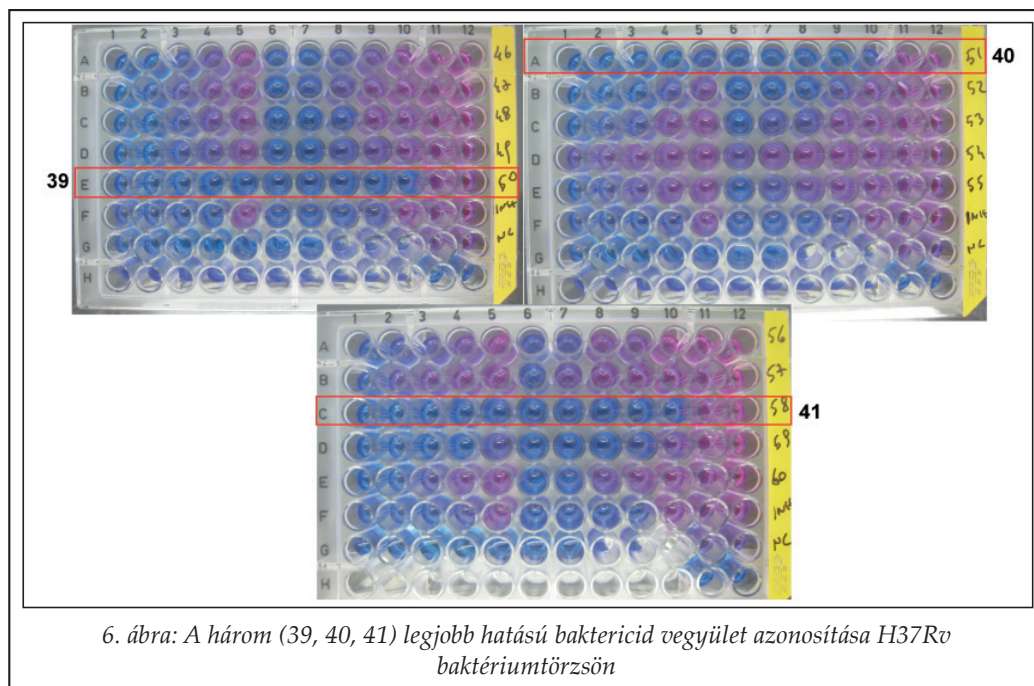
Pár vegyületnél vizsgáltuk a PknG gátló hatást is, egy PknB-PknG kettős gátló reményében, de csak a 17-es vegyület ért el 75%-os inhibíciós értéket 10 μM koncentrációban.

NAD szintetáz gátlók vizsgálata

Mivel a NAD szintetáz is kulcsenzim a *Mycobacterium tuberculosis* növekedéséhez, ígéretes célpontnak látszik a betegség gyógyításá-



5. ábra: Előállított kinoxalin származékok [19].



hoz. A vizsgálatunkat ez esetben is egy korábbi virtuális szűrésre alapoztuk, mely alapján ötven vegyületet választottunk ki tesztelésre. A molekulák közül huszonkettő mutatott 50% feletti gátlóértéket 100 μ M-ban. Az IC₅₀ értékeket csak a 75% feletti gátlóértékeknél határoztuk meg, melyeket a IV. táblázat szemlélteti.

A vegyületek IC₅₀ értéke 50-70 μ M közé esik és ez messze elmarad a legjobb kinázgátlók értékeitől, viszont a molekulatervezéshez megfelelő kiindulás volt. A vegyületeket ligand alapú farmakofór modellezéssel és molekulatervezéssel fejlesztettük tovább. Az új molekulacsalád képviselői már 1-10 μ M közötti IC₅₀ értékkel rendelkeznek.

H37Rv baktériumtörzsön történő vizsgálatok

A hatékony PknB és PknG inhibitorokat leteszteltük élő baktériumtörzsön, hogy meghatározzuk baktericid hatásukat. A MIC értékek szinte kivétel nélkül >100 μ M-osak voltak, tehát érdemben egyikük sem gátolta a *Mycobacterium tuberculosis* növekedését. Ez magyarázható azzal, hogy a PknG kináz jelentősége a fagocitózist követően nő meg és a makrofágokon kívüli túléléshez nem nélkülözhetetlen a fehérje, illetve a másik magyarázat az lehet, hogy vegyületek nem képesek átjutni a baktérium komplex sejtfalán.

A NAD szintetáz gátló vegyületek esetén 30-100 μ M közötti MIC értékeket mértünk, ami szintén elmarad a várt értékektől.

Ezt követően H37Rv baktériumtörzsön végeztünk előszűréseket és három ígéretes vegyületcsaládot sikerült azonosítottunk (4. ábra).

A 32-es kinoxalin és 34-es sztiril-kinazolin alapvázú vegyületeket továbbfejlesztve sikerült nanomólos MIC értékkel rendelkező molekulákat előállítani (V. táblázat) és némi előzetes szerkezet-

hatás összefüggéseket levonni.

A 35-38 vegyületek a 32-es kinoxalin módosításával jöttek létre (5. ábra). Az eredményekből kitűnik, hogy a hatáshoz fontos a nitro csoport megléte és helyzete (37-es, 38-as vegyület hatástalan). Próbálkoztunk a fenil- és metil csoport felcserélésével is, azonban ez is hatáscsökkenést okozott (36-os vegyület), a bróm szubsztituens cseréje trifluormetil csoportra (35-ös vegyület) viszont több mint négyszeres javulást eredményezett. A kinoxalin származékok esetén feltételezhető, hogy a vegyületek célfehérjéje a DprE1. *Mycobacterium smegmatis*-on és *M. bovis*-on végzett vizsgálatok során a DprE1 fehérjén bekövetkezett mutációt követően a 32-es vegyület hatása jelentősen romlott illetve teljesen elmaradt [5].

A 34-es számú sztiril-kinazolinon végzett módosításokkal hoztuk létre a 39-41 molekulákat és a vegyületek vizsgáltata valamint szintézise jelenleg is tart. A kiindulási vegyület (34) célpontja az FtsZ fehérje [20], mely az aktin bakteriális ortológja, így gátlása alkalmas a baktérium osztódásának megakadályozására. Feltételezzük, hogy a származékoknak is ez a hatásmechanizmusa, ezért a legjobb vegyületeket (39, 40, 41) kiválasztottuk további vizsgálatok (alvó baktériumtörzs, ADMET, *in vivo* állat kísérlet) és optimalizálás céljából.

Következtetések

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a kitűzött céloknak megfelelően előállítottunk és vizsgált-

tunk vegyületcsaládokat, melyek képesek beavatkozni a *Mycobacterium tuberculosis* jelátviteli útvonalába és ezúton befolyásolni a baktérium növekedését, túlélését illetve előidézni magát az eradikációt.

A hatékony kinázgátló vegyületek (PknB- és PknG gátlók) kináz paneleken és fertőzött makrofágokon rendkívül hatékonyak voltak, viszont élő baktériumtörzsön a várt hatás elmaradt. Az eddigi tapasztalataink mind azt támasztják alá, hogy hiába nagyon jó hatású egy vegyület *in vitro*, ez nem elégséges feltétel az antituberkulotikus hatás eléréséhez. Számítógépes algoritmusok segítségével meghatároztuk a vegyületek logP és logS értékeit, és mivel az általunk előállított vegyületek clogP értékei tipikusan 2-5 tartományban voltak, a clogS adatok pedig -3-nál alacsonyabbak, azt feltételezzük, hogy a vegyületeink rossz oldhatósága az, ami akadályozza a baktériumba való bejutást.

A NAD szintetázon vizsgált vegyületek esetén szintén a rossz oldhatóság valamint a molekulák mérete okolható a hatás elmaradásáért élő baktériumon.

A H37Rv baktériumtörzsön történő tesztek hozták meg az átütő sikert, melyek során három vezérmolekulát is azonosítottunk. A vezérmolekulák köré kialakított vegyülettárak szintézise során ügyeltünk arra, hogy olyan funkciós csoportokat is beépítsünk a molekulákba, melyek növelik az oldhatóságot. Az így előállított sztilil-kinazolin vegyületek közül három származék mutatott kiemelkedő hatást baktériumon, ezért további vizsgálatokat és optimalizációt tervezünk, egy kellően hatékony és megfelelő ADMET tulajdonságokkal rendelkező gyógyszerjelölt molekula kifejlesztése céljából.

Támogatás

A kutatás nemzetközi együttműködés révén jött

létre és a MUKIT pályázat (szerződésszám: OMFB-00132/2010) keretében valósult meg.

Köszönet illeti a Unité de Pathogénomique Mycobactérienne Intégrée (UPMI) valamint Unité de Microbiologie Structurale (UMS) Pasteur intézeteket a szakmai segítségért. Mindemellett köszönetet mondunk Dr. Dancsó Andrásnak a molekulamodellezésben nyújtott segítségért és hasznos tanácsaiért.

IRODALOM

1. World Health Organization (WHO). (2012). Global Tuberculosis Report. ISBN: 978-92-4-156450-2.
2. Parrish N.M., Dick J.D., Bishai W.R.: Trends Microbiol., 6, 107-112 (1998).
3. Frieden T.R., Sterling T.R., Munsiff S.S., Watt C.J., Dye C.: Lancet, 362, 887-899 (2003).
4. Chan E.D., Iseman M.D.: Curr Opin Infect Dis. 21(6), 587-95 (2008).
5. Magnet S. et al.: Tuberculosis, 90, 354-360 (2010).
6. Cole S.T. et al.: Nature, 393, 537-544 (1998).
7. Av-Gay Y. et al.: Trends Microbiol. 8, 238-244 (2000).
8. Sassetti C.M., Boyd D.H., Rubin E.J.: Mol. Microbiol. 48, 77-84 (2003).
9. Walburger A. et al.: Science, 304, 1800-1804 (2004).
10. Av-Gay Y. et al: Infect. Immun. 67, 5676-5682 (1997).
11. Singh A. et al.: Tuberculosis 86, 28-33 (2006).
12. Fernandez P. et al: J. Bacteriol. 188, 7778-7784 (2006).
13. Magni G. et al.: Curr Med Chem. 16(11), 1372-1390 (2009).
14. Garavaglia S. et al: J Biol Chem. 279(39), 40980-40986 (2004).
15. Rizzi M, Schindelin H.: Curr Opin Struct Biol. 12(6), 709-720 (2002).
16. Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ.: Mol Microbiol. 48(1), 77-84 (2003).
17. Székely R et al: Immunol Lett. 116(2), 225-231 (2008).
18. Hegymegi-Barakonyi B, Székely R et al.: Curr Med Chem. 15(26), 2760-2770 (2008)..
19. Quinoxaline derivatives and their use for the treatment of mycobacterial infections Magyar szabadalmi bejelentés, 2011. október 3., Bejelentés szám: P1000356
20. Margalit DN et al: Proc Natl Acad Sci U S A., 2004, 101(32), 11821-11826

Nano- és mikroszál rendszerek előállítás és gyógyszerészeti alkalmazásuk lehetőségei I.

SEBE ISTVÁN, PETZKE MÁTÉ, ZELKÓ ROMÁNA*, SZABÓ BARNABÁS

Egyetemi Gyógyszertár Gyógyszerügyi Szervezési Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest, Hőgyes E. u. 7-9. – 1092

*Levelezési cím: zelko.romana@pharma.semmelweis-univ.hu

Summary

Sebe, I., Petzke M., Zelkó, R., Szabó, B.: Preparation and pharmaceutical application possibilities of nano- and microfiber systems I.

The application of nanoactive drugs and nanostructured drug delivery systems enables the increase of bioavailability of active agents of unfavorable physical and chemical characteristics, thus assuring the basis of the cost-effective therapy.

Fiber formation procedures (high speed rotary/centrifugal spinning, blow/jet spinning, electrospinning, melt spinning, emulsion spinning) have long been known to create micro- and nano-size range polymeric fibers, while in the pharmaceutical industry they still seldom applied, therefore their implementation provides new opportunities mainly in the field of pharmaceutical technology. The present paper provides an overview of different types of spinning methods and their principle. The manuscript compares the spinning technologies, points out their advantages and limitations, and highlights the potential opportunities for pharmaceutical use, as well.

Keywords: nano- and microfiber, wet spinning, dry spinning, high speed rotary/centrifugal spinning, blow/jet spinning, electrospinning, melt spinning, emulsion spinning

Összefoglaló

Nanoaktív hatóanyagok, valamint nanostrukturált gyógyszerhordozó rendszerek alkalmazásával lehetővé válik kedvezőtlen fizikai-kémiai tulajdonságú hatóanyagok biohasznosíthatóságának növelése, amely a költséghatékony terápia alapja. A szálképzési eljárások (nedves, száraz, rotációs, pneumatikus, elektrosztatikus, olvadékos, emulziós szálképzés) régóta ismertek mikro- és nanomérettartományba eső polimerszálak létrehozására. Ezek a technikák a gyógyszeriparban még ritkán alkalmazottak, elsősorban a gyógyszer technológia területén nyithatnak új távolokat. A közlemény áttekintést nyújt a különböző szálképzési módszerek típusairól és azok elvéről, összehasonlítja a technológiákat, kiemeli azok előnyeit, korlátait és rávilágít a potenciális gyógyszer technológiai alkalmazásuk lehetőségeire is.

Kulcsszavak: nano- és mikroszál, nedves szálképzés, száraz szálképzés, rotációs, pneumatikus, elektrosztatikus, olvadékos, emulziós szálképzés

Bevezetés

A gyógyszeripar fejlődésével újabb és újabb molekuláris célpontok (ún. *targetek*), ígéretes vezérmolekulák, potenciális hatóanyagok jelennek meg. A közelmúltban felfedezett molekulák többsége azonban valamely fizikai vagy kémiai tulajdonságában nem megfelelő, valószínűleg sohasem válhatnának gyógyszerre, ha az új entitások felfedezése nem járna ilyen nagy költségekkel, valamint, ha tömegével állnának rendelkezésre ideális hatóanyag-jelöltek. Azonban, pontosan az iparág alkotói válságának köszönhetően, a vezető vállalatok is kezdik felvállalni ezeket a problémás molekulákat, komoly szakmai kihívások elé állítva a technológusokat. Az említett új moleku-

lák gyakran rossz vízoldékonyságúak, levegőre és nedvességre érzékenyek, több polimorf módosulattal rendelkeznek, amelyek jelentősen különböznek egymástól mind oldhatóságukban, mind hatásukban.

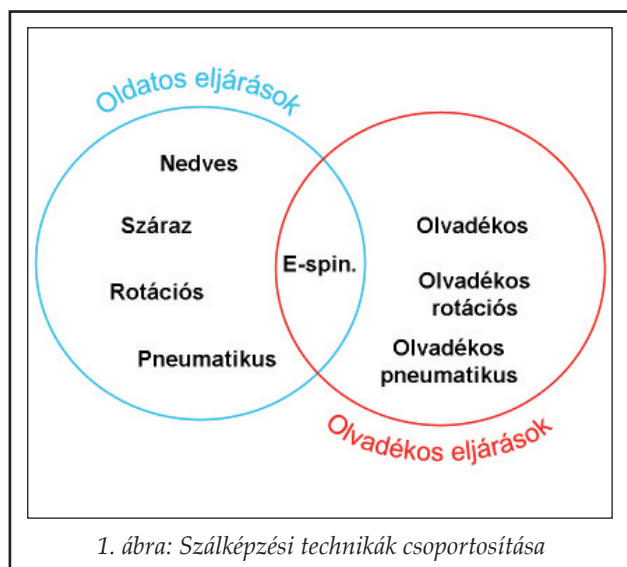
Jelen összefoglaló célja azoknak a technológiai módszereknek a bemutatása, amelyek segítségével az érzékeny és/vagy rosszul oldódó anyagok nagy fajlagos felülettel rendelkező, szálak struktúrákká formulálhatók. A következő fejezetekben tárgyalt eljárások elvükben és kivitelezésükben is jelentősen eltérnek egymástól, így független módszereként más-más technológiai probléma megoldására alkalmasak, hasonlóságuk révén viszont kombinálhatók egymással, ötvözve az egyes eljárások előnyös tulajdonságait.

Technológiai módszerek az oldhatóság növelésére

Az oldhatóság növelése régóta fennálló technológiai probléma, így a formulálási technikák között újnak számító szálképzési eljárásokon kívül is találunk erre megfelelő módszereket.

Az elméletében legegyszerűbb módszer az őrlés, ha a hatóanyag szilárd fázisa lassan oldódik, részecskeméretének csökkentésével a fajlagos felülete akár nagyságrendekkel növekedhet, így módon a kémiai változatlan anyag oldódási sebessége jelentősen növelhető. Az őrlési módszereknek egész családja alakult ki a hagyományos, hétköznapi életben is alkalmazott száraz őrléstől, az együtt őrlésen át (ún. *co-milling*) a nedves közegű őrlési technikákig. Nemcsak őrléssel érhető el az oldódási sebesség növekedése, gyakran használunk kémiai módosítást (pl. *in situ* sóképzést), illetve különböző oldószeres vagy olvasztásos módszereket, mint például porlasztva szárítást, fagyasztva szárítást, olvadékos granulálást vagy extrúziót.

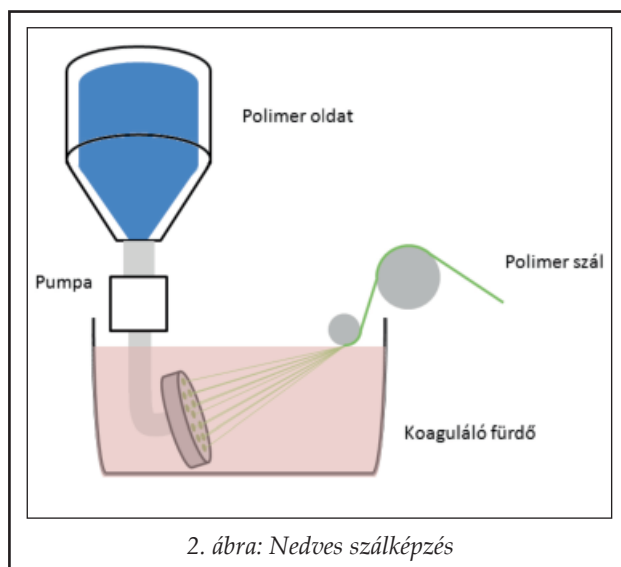
A fenti technikákkal általában a hatóanyag kristályformáját, morfológiáját változtatjuk meg, így a részecskeméret-csökkentés során létrejövő amorf állapotú anyagok magas energiatartalmuk miatt jobb oldékonysággal jellemezhetők, mint kristályos formáik. A jelen közlemény tárgyát képező szálképzési eljárások is ez utóbbi, oldószeres vagy olvasztásos technológiai eljárások közé tartoznak, a folyamatok során keletkező anyagok makroszkópikus megjelenése különbözteti meg őket a rokon eljárásoktól. Az 1. ábra foglalja össze a különböző szálképzési módszereket.



Nedves szálképzés (*wet spinning*)

A nedves szálképzés a legrégebben használt szálképzési technika. Az első mesterséges polimerszál a műselyem volt, amelyet először 1855 körül George Audemars állított elő, majd iparban is alkalmazható technikával Hilaire de Chardonnet (1839-1924), francia tudós készített a selyemhernyó táplálékául szolgáló eperfalevélből kinyert nitrocellulózból. A Louis Pasteur-rel közös, egy selyemhernyókat támadó járvány megfékezésére irányuló munkájuk közben, 1878-ban felfedezett eljárásból származó első polimer szálak extrém gyúlékonyak voltak, denitrálásukkal azonban a felfedező stabil, cellulóz-alapú műselyemhez jutott [2]. A műselymen kívül számos más szövet is ezzel az eljárással készül, így például a paraaramid szerkezetű, az acélnál 5-ször erősebb Kevlar (DuPont, 1965) vagy a hagyományos műselyemgyártásnál környezetbarátabb eljárással készült Tencel® (Courtaulds Research), amelyhez alternatív oldószerként nem-toxikus N-metilmorfolin-N-oxidot alkalmaznak.

A nedves szálképzési eljárást leginkább a szálképzés közege különbözteti meg a többi módszertől. A technika nevéből is látható, hogy a termék folyadék közegben alakul ki, amely az esetek többségében valamilyen vizes oldat (2. ábra). Mivel a folyadékoknak a gázokénál sokkal nagyobb a viszkozitásuk, ez nagy mechanikai terhelést jelent a szálakra nézve, így a többi szálképzési módszerénél kisebb, kb. 200-250 méter percenkénti termelési sebesség érhető el (az olvadékos szálképzésnél ez akár 1500-2000 m/perc is lehet). A folyadék- vagy koaguláló-fürdő, amelybe a szálak ke-



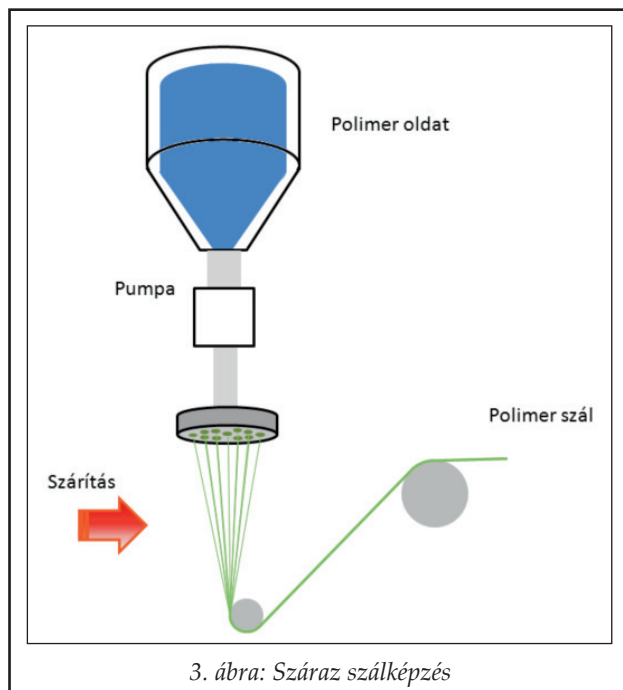
rülnek, általában nem oldószere az alkalmazott polimernek, így a szálak felületén kicsapódik a hordozó, a szál megszilárdul, majd egy mosási fázist követően, amely során eltávolítják belőle az oldószermaradványokat, gyűjthető, tovább alakítható.

Az irodalomban az alginsav vagy Na-sójának alkalmazása CaCl_2 koaguláló fürdővel [3], polikaprolakton (PCL) használata metanosos vagy acetonos [4], illetve kitin butanosos fürdővel [5] végzett szálképzési eljárása is megtalálható, a módszer polimer keverékek esetében is használható (zselatin-alginát [6], keményítő-PCL [7]), de kereskedelmi forgalomban még nincs ezzel a módszerrel készült gyógyszeripari termék. Az oldószermaradványok a szigorú előírt határértékek miatt komoly problémát jelenthetnek a termékek előállításakor, azonban a szerves oldószerek használatát egyes esetekben el lehet kerülni, pl. kitozán esetében a pseudo-száraz szálképzési módszerrel, amely során a hagyományos kicsapó fürdő helyett ammónia gázzal végezték el az ecetsavas polimeroldatból történő koagulálást [8].

Száraz szálképzés (*dry spinning*)

A technika első alapanyagát, a cellulóz-acetátot 1865-ben állították először elő, celluloid filmként, valamint kámforral keverve (Cellon®, 1909) lopakodó repülőgépek bevonataként vált ismertté. A száraz szálképzési technika kifejlesztésével (Celanese®, Celanese Corporation, 1924) válhatott textiliparilag is felhasználhatóvá, miközben szűrők, kártyák és az eredeti LEGO® építőelemek alapanyaga is lett. Szintén a száraz eljárással készül az 1939-ben vinilklorid-vinilacetát kopolimerből előállított, Vinyon® fantázianevű szálal anyag, amely bár alacsony hőfokon megolvad, mégis lángálló (tehát nem gyullad meg), tömény savaknak és bázisoknak egyaránt ellenáll, valamint kiváló vízzáró képességű [9]. Bár alacsony olvadáspontja és szerves oldószerekben történő gyors oldódása miatt ipari alkalmazása igen limitált, a Cordelan® (Kohjin Int. Corp., 1974) nevű 50 %-ban Vinyon-t tartalmazó, így nem gyúlékony mátrix szál az alvóruházatok, főként a babaruhák kedvelt alkotója. A módszer alkalmazási köre 1959-ben újabb polimerrel, a DuPont által forgalomba hozott igen drága, Spandex fantázianévű, poliuretán-alapú textilipari alapanyaggal (amelynek neve az angol „*expands*”, azaz „kitágul” kifejezés anagrammája) bővült.

A száraz szálképzési eljárás során a polimer



3. ábra: Száraz szálképzés

szálakat légnemű közegbe préselik ki, ahol egy egyszerű szárítási lépésben (általában meleg levegővel) eltávolítják belőlük a nedvességtartalmat, a szálak megszilárdulnak, feldolgozhatóvá válnak (3. ábra). Az eljárás során az oldószermaradványok jelentenek problémát, sok polimer esetében nem megoldható a vizes/alkoholos oldatból történő szálképzés, alternatív oldószert használatára van szükség (pl. acetonra [5] vagy dimetil-acetamidra).

Az irodalomban, a nedves szálképzési eljárás-hoz hasonlóan, számos gyógyszerészeti polimer (pl. a kitozán dibutirilcitozán-formában [5] vagy a politejsav (PLA) [10]) alkalmazása található meg, de gyógyszeripari termék még ezzel az eljárással sem került a piacra.

Rotációs szálképzés (*Forcespinning®*, *centrifugal spinning*, *high-speed rotary spinning*)

A védjeggyel is védett [11] rotációs szálképzés (angolul: *high-speed rotary jet spinning*, *forcespinning*, *centrifugal spinning*) egy olyan, elsősorban ipari technológia, amely főként a műanyaggyártáshoz, textiliparhoz köthető. Egyéb irányú alkalmazása csak az utóbbi pár évben került az érdeklődés homlokterébe a hatóanyag tárolására alkalmas gyógyszerhordozó rendszerek kutatása vagy a biodegradálható polimer szövetek előállítása [12] területén, de kereskedelmi forgalomban lévő gyógyszeripari termék még nem készült. A szálak kialakítása a nagysebességű forgás következtében kialakuló centrifugális erő hatására történik [13].

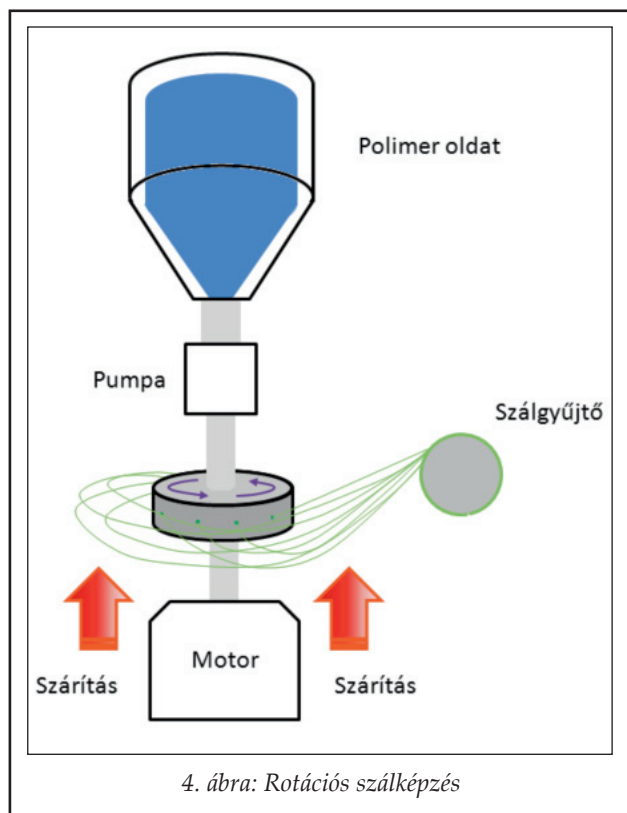
Megfelelő analógiával élve a laboratóriumi körülmények között történő előállítás a vattacukor készítéséhez hasonlatos, azonban nem olvadék, hanem oldat a kiindulási anyag, valamint az eszköz műszaki felépítése is kicsit eltér vattacukor-készítőtől. Hőre érzékeny hatóanyagok esetén a módszer alkalmazható oldatok, illetve olyan diszperz rendszerek esetében is, ahol a diszpergált részecskék a kolloid mérettartományba esnek. Alapanyagként megfelelő molekulatömegű és viszkozitású polimerek használhatók. A készülék legfőbb alkatrésze az a tartály, amelynek oldalsó falán 0,15-0,5 mm átmérőjű furatok [14] (4. ábra) vagy hagyományos (24-30 G) fecskendő tűk [15, 16] helyezkednek el. A furatok távolságát és számát a forgó alkatrész átmérője határozza meg. Szálképzés közben a polimer oldatot tartalmazó tartály 1000–10000/perc fordulatszámon forog. A kerületi sebesség a középpontot jelentő tengely felől haladva a palást irányába nő. A forgó rendszerben, radiálisan kifelé irányuló centrifugális erő az alkatrészbe helyezett anyagot a tömeggel arányos mértékben a palásthöz szorítja. E kényszerítő erő a folyadék furaton való átpréselődését eredményezi. A furat túloldalán az anyag kisebb csepp formájában gyűlik össze, amely tehetetlenségéből következően kirepül, miközben a folyamatosan pótlódó anyagot magával húzza. A szál folytonosságát a

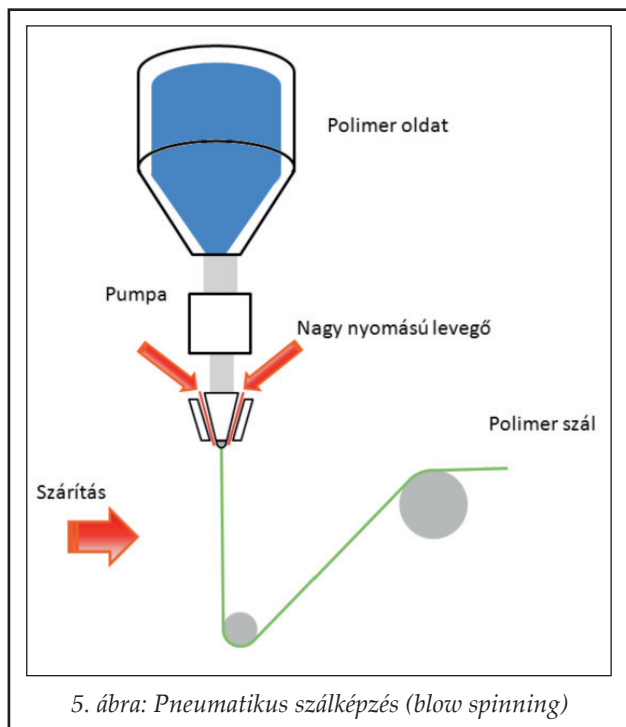
viszkozitás és a felületi feszültség biztosítja, míg az elvékonyodás mértékét a forgási és párolgási sebesség, valamint a szálak gyűjtésére szolgáló kollektor távolsága határozza meg. A szálak keletkezésekor az oldószer jelentős része elpárolog. Az előállított szálak összetételét és minőségét befolyásolhatja a forgó tartályban kialakuló fázis szeparáció és az oldat kiáramlásának sebessége is. Kísérletileg meghatározható optimális anyagmennyiség felett a megnövekedett préselő az anyag túl intenzív utánpótlásához és a szálak cseppesedéséhez vezet. A szálak gyűjtése történhet a forgó fejet 20-40 cm távolságban körülölelő tömör lemez vagy kollektorsor, illetve a forgási síkban elhelyezett forgó szálgyűjtő segítségével. Ez utóbbi megoldás a szálak további nyújtását eredményezheti. Mindkét esetben alkalmazhatunk a gyűjtőre kapcsolt elektrosztatikus töltést is, amely a szálak irányított felfogását teszi lehetővé.

Pneumatikus szálképzés (*blow spinning, jet spinning*)

A szálképzési eljárások sorában a pneumatikus úton történő előállítás viszonylag rövid, nagyjából tizenöt éves múltra tekint vissza, főként textil- és szilikátiparbeli felhasználása ismeretes. 2003-ban olyan ritkaföldfém tartalmú kerámia rostokat készítettek ezzel az eljárással szolgél rendszerekből [17], amelyek hőkezelés után rendkívül rugalmasá váltak. 2009-ben jelent meg az első olyan publikáció, amelyben polimer oldat alapú mikroszálak előállításának metodikáját írták le [18]. A módszer gyógyszerészeti alkalmazása még nem ismert, aminek legfőbb oka feltehetően az, hogy a sorra megjelenő rokon technikák is még részben kiaknázatlanok. A különböző funkciójú mesterséges „szövetek” tervezése (*tissue engineering*) terén azonban már több jelentős eredmény született. Előállítható olyan nanostruktúrájú membrán, ami az *in vitro* kísérletek alapján progeszteron szabályozott, közel nulladrendű felszabadulását teszi lehetővé állatokban [19], de csontszöveti, hidroxipapatit/politejsav hibrid kompozit alapú implantátumokat is állítottak már elő [20].

A pneumatikus szálképzés a nagynyomású levegő mechanikai energiáját hasznosító eljárás. Elvi alapja a hagyományos folyadékporlasztásával közel azonos. A szálak képződése egy olyan, többcsatornás koaxiális rendszerű, állítható csatornamélységű porlasztó fejjel történik, amelyben a polimer oldat egy végén elszűkülő, 2-3 mm átmérőjű primer kapillárison keresztül áramlik ki (5. ábra).



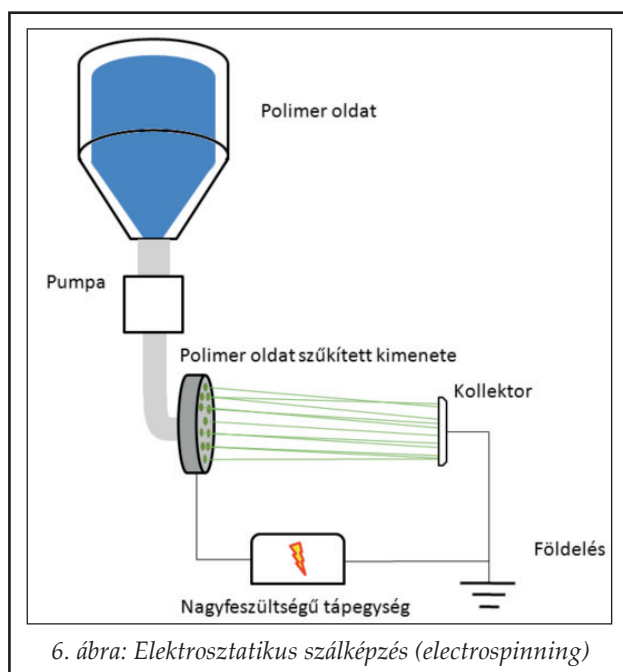


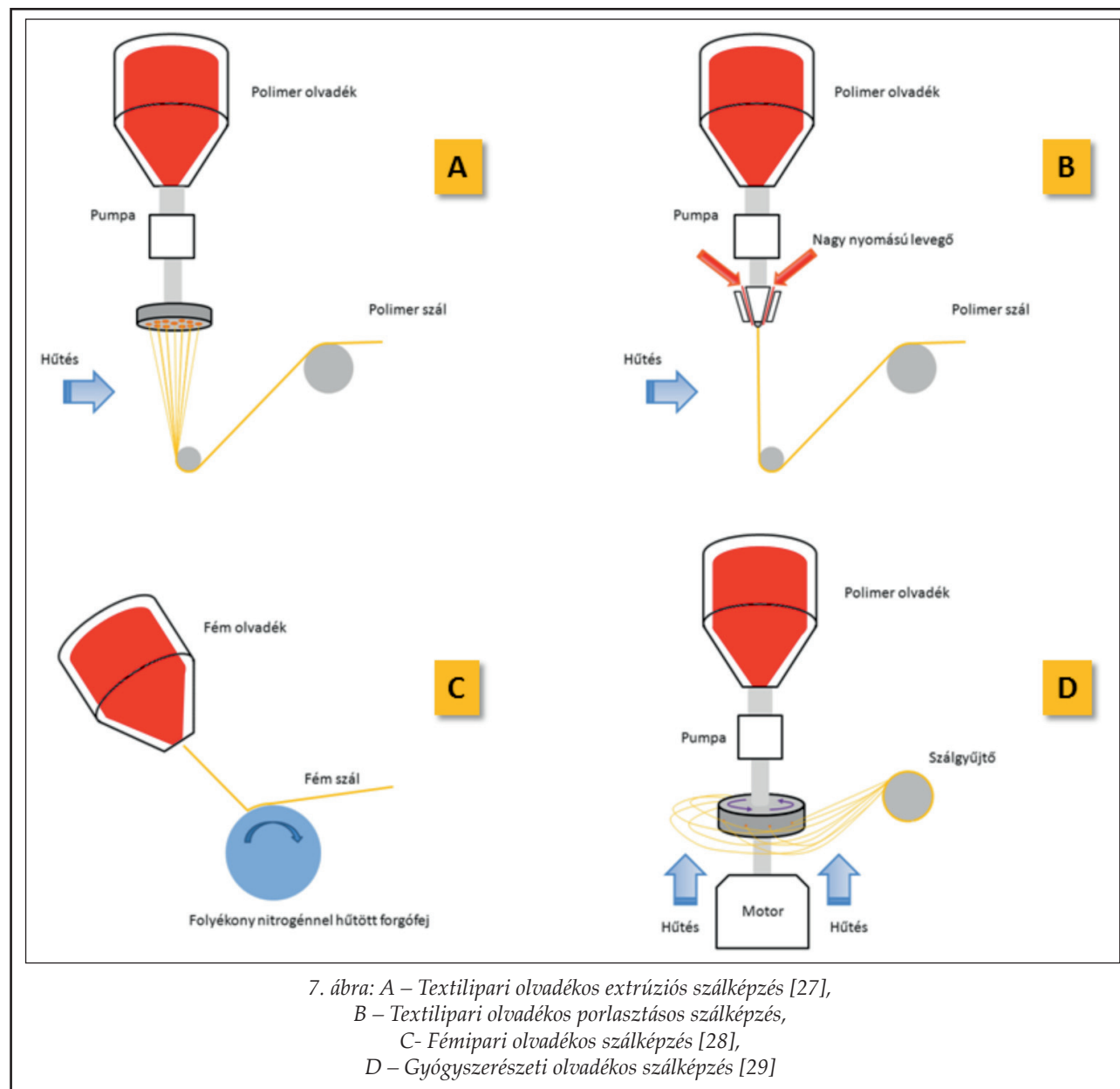
E kapilláris a nagyjából 5 mm átmérőjű, szintén elszűkülő szekunder csatorna hossz tengelyében helyezkedik el. A szekunder csatornában két, parallel pozíciójú betáplálási ponton keresztül nagy nyomású levegőt áramoltatnak át. A levegőáram által koncentrikusan körbefogott primer kapilláris végére érkező folyadékcsepp a fellépő erők hatására megnyúlik, megfelelő felületi feszültség esetén nem porlasztott folyadék, hanem folytonos szál képződik.

Elektrosztatikus szálképzés (electrospinning)

A szálképzési technikák közül kétségtelenül az elektrosztatikus szálképzés tekinthető a legelterjedtebbnek, bár szélesebb körben történő felhasználása csak az utóbbi két évtizedben kezdett kibontakozni. Az első szabadalmat J.F. Cooley és W.J. Morton nyújtották be 1902-ben [21]. A módszer őrzi prioritását a nano- és mikroszálás alapú gyógyszerészeti alkalmazások területén is. A szálak előállítása oldat fázisból, diszperzióból vagy olvadékból történhet. A szálakat az egyenáramú nagyfeszültség által keletkező elektrosztatikus erők hozzák létre. Az eljárás során egy elektromosan vezető vékony kapilláris nagyfeszültség alá helyeznek, amelyen a polimer oldatot jól definiált térfogati sebességgel áramoltatják keresztül [22]. A kapilláris tengelyére merőleges síkban egy szintén elektromosan vezető kollektor lemezt helyeznek el, amelyet hálózati egyenpotenciálra kapcsolnak (6. ábra). Elektroszta-

kus szálképzésre többnyire szintén elektromosan vezető folyadékok, elektrosztatikusan feltölthető polimerek alkalmasak. A szálak keletkezésénél az elektrosztatikából ismeretes jelenségek és törvényszerűségek érvényesülnek, a kapilláris hegyére érkező folyadékcsepp csaknem gömbszimmetrikus geometriai testként értelmezhető, de alakját az elektrosztatikus tér megváltoztatja, a deformáció pedig a töltések inhomogén eloszlását eredményezi a csepp felületén. A csepp legnagyobb görbületű pontján, a csúcshatás következtében kialakuló kitörési pontokból, az ún. Taylor kúpokból, ionizált anyagáramlás indul meg a kollektor felé. Optimális felületi feszültséggel rendelkező oldatok esetében az elektromosan feltöltött anyag lép ki a csepp felszínéről. Egyszerre több szál is képződhet, amelyek mozgásuk során folyamatosan nyúlnak és elvékonyodnak. Adott összetételű szál vastagságát az alkalmazott feszültség és a kollektorok távolsága határozza meg, illetve annak a folyadéksugárnak a stabilitása, amelyből keletkezik. A stabilitásért a folyadék felületi feszültsége, míg a nyújtásért az elektrosztatikus erők a felelősek. E két paraméter hányadosa az ún. Rayleigh-féle hasadási index [23]. Kellően nagy felületi feszültség esetén nyújtáskor a folyadéksugár nem szakad el, így hosszú szálakat kapunk. A sugár által megtett út során az oldószer nagyobb része elpárolog vagy az olvadék kellően lehűl, valamint a töltések is elvezetődnek a levegő ionizációja közben, így kialakul a szilárd forma. Mivel a párhuzamosan keletkező szálak azonos töltéseket hordoznak, így taszításuk révén spirális pá-





lyát írják le, egymásba kapaszkodva rendezetlen szerkezetet hoznak létre. Ez egy fontos jellemzője az elektrosztatikus szálképzésnek, hiszen elkerülhetetlen a szálak közötti kapcsolódási pontok kialakulása. A kollektoron végeredményként egy szövetszerű, orientáció nélküli szálak struktúrájú lapkát kapunk.

Olvadékos szálképzés (*melt spinning*)

Az olvadékos szálképzés története 1932-ben, a W.H. Carothers és J. W. Hill által előállított 3-16- ω -észter szálakkal kezdődött [24]. Később üvegszálakat [25], majd a bazalt nevű, hazánkban is több helyen fellelhető (pl. Badacsony, Ság, Som-

ló, Pécskö, Somoskő) vulkanikus eredetű, főként macskakőként ismert kőzetből a szigeteléstechikában alkalmazott, ún. bazaltgyapotot [26] állítottak elő ezzel az eljárással. A textiliparban az 50-es évek óta, nem-szőtt kelmékhez felhasznált, polietilén-, polipropilén-, poliamid- (pl. Nylon), poliuretán- és poliészter-alapú textilszálak előállítására használják [27,28].

Az olvadékos szálképzési technika a száraz szálképzéshez hasonló módszer, ipari megvalósításának sémáját mutatja be a 7. ábra. Ez a leggyakrabban textil- és műanyagiparban alkalmazott elrendezés az olvadékos extrúzió (*hot melt extrusion*, 7. ábra-A) egy változatának tekinthető. A megoldás lényege, hogy a megfelelő hőmérsékletű és

viszkózitású olvadékot egy vagy több résen préselek át, miközben a szálak fajlagos felülete megnő, így gyorsan lehűthetők, megszilárdíthatók. Az eljárás a magyar nyelven külön nevet nem viselő *melt blowing* technika formájában is ismert, amely során a kis viszkózitású olvadékból nagynyomású gázzal alakítják ki a textilszálakat (7. ábra-B). A 7. ábra "C" részén a fémfeldolgozó ipar azonos nevű eljárásának vázlata látható, ez a technika a fémek és fémkeverékek olvadékainak gyors lehűtésére szolgál. Az előző technikától eltérően nem csak a kimeneti közeget, hanem az olvadékkal közvetlenül érintkező forgó részt is hűtik, így akár 10^7 K/s hűtési sebesség is elérhető. A 7. ábrán ("D" rész) a gyógyszeripari felhasználás szempontjából legjelentősebb, a hétköznapi életben vattacukor készítésként ismert eljárás [29] látható, ennél a módszernél az alapanyagot egy nagy sebességgel forgó, lyukakkal ellátott, fűthető pörgettyű tartalmazza, az olvadékot a centrifugális erő préseli ki a hűtött közegbe. Bár a módszerek technikai megvalósítása jelentősen különbözik, alapelvük mégis azonos, a kiindulási anyagokat megolvasztják, majd egy vagy több résen keresztülréselik. A rés túlsó oldalán a szálak, forró anyagot nyújtják és lehűtik, a szálak ily módon megszilárdulnak, gyűjthetővé, tovább feldolgozhatóvá válnak. Mivel az olvadékos szálképzés oldószermentes és az oldatos módszerekénél lényegesen nagyobb termelékenységgel valósítható meg, terméke egy egyszerű szárítási lépéssel előállítható, az eljárást több iparágban nagy volumenben alkalmazzák.

Az olvadékos szálképzési technika gyógyszeripari alkalmazási jelenleg még igen kis jelentőségű a más, oldékonyságot, illetve oldódási sebességet fokozó technológiák mellett. Bár már több tudományos cikk [33] és szabadalom született [34, 35] potenciális gyógyszerészeti segédanyagok „vattacukorra” alakítására, jelenleg csak egyetlen ilyen technikával készült termékcsalád van forgalomban, a 200 mg ibuprofént folyadék nélkül bevehető formában tartalmazó Nurofen® Meltlet (Biovail Corporation, jelenleg a Reckitt Benckiser terméke) [36].

Emulziós szálképzés (*emulsion spinning*)

Bár az oldatos és az olvadékos szálképzési technikák egész családja áll rendelkezésre, mégis vannak olyan rosszul oldódó és magas olvadáspontú polimerek, amelyek egyik hagyományos módszerrel sem dolgozhatóak fel. Ilyen polimer például a Roy J. Plunkett által 1938-ban előállított, mára világszerte ismert politetrafluor-etilén, a Teflon®

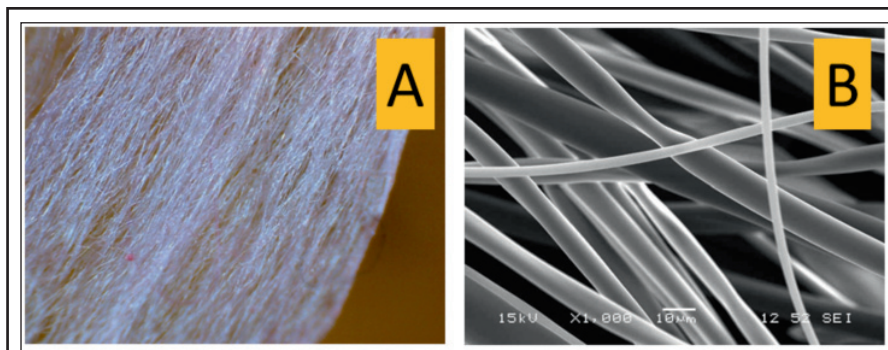
(DuPont [37]). A Teflon, amely alkalmazásának elterjedését annak köszönheti, hogy hidrofób és lipofób egyszerre, sem vízben, sem szerves oldószerekben nem oldódik. Mivel nincs oldószere, perfluorooktánsavval emulziós rendszert készítenek belőle, amelyből már előállítható szálak struktúra (Gore-Tex®, 1958). A teflonszálak ma is a szabadidő-, technikai- és katonai-ruházat fontos elemei, újabb fajtáik már tartósan vízállóak, szélállóak, ugyanakkor remekül szellőznek, így a teflonszálak gyártására és forgalmazására 1958-ban alapított Gore cég ma is rajta van az Egyesült Államok legnagyobb 200 magánkézben lévő cégének listáján (2012-ben 132. helyezett volt [38]).

Szintén emulziós technikákkal állíthatók elő olyan oldhatatlan anyagok szálai, mint például a kerámiáké. Az alapanyag szuszpenziójából vízzel keverve, éghető polimert keverve keverékszál készíthető. A szálból a segéd polimert ezután hőkezélik (pl. elégetik), így a szerves polimer eltávolítható, csak a kerámiaszál marad vissza [39].

Szálak rendszerű gyógyszerformák előállítása

A szál, mint hatóanyag tárolására alkalmas struktúra

Joggal merül fel az a kérdés, hogy vajon a szálak milyen módon képesek hatóanyagot tárolni. A kialakuló rendszert makro- és mikroszerkezet szerint lehet görcső alá venni. Globális értelemben véve makroszerkezet alatt a szálak közötti elrendeződést (8. ábra) és az ebből következő fizikai-kémiai tulajdonságokat, míg mikroszerkezet alatt az egy szálon belüli inter- és intramolekuláris viszonyokat és az ebből származó fizikai-kémiai tulajdonságokat értjük, amelyek természetesen átfedésben vannak egymással. A kialakuló struktúrát jelentősen befolyásolja az előállítás módja (elektrosztatikus-, rotációs-, pneumatikus szálképzés stb.), körülményei (koncentráció, halmazállapot, hőmérséklet, feszültség, fordulatszám) és a felhasznált alapanyag kémiai minősége (polivinil-pirrolidon, politejsav, polietilén-oxid). Bármilyen kiindulási fázisról is legyen szó, a létrejövő szálak a hatóanyagot molekuláris szinten eloszlatva tartalmazzák, szilárd diszperziós rendszerek. A hatóanyag tárolását nem csupán a kialakult mikroszerkezet teszi lehetővé, hanem a makroszkopikus értelemben vett valamely típusú felületi adhézió is. E rendszerek alkalmazása területén egy előre-mutatott lehetőség olyan nanoszálak készítmények előállítása, amelyek részben felületen kötött peptid alapú hatóanyagot tartalmaznak [40].



8. ábra: A – Nano- és mikroszálak optikai mikroszkópos felvétele,
B – Nano- és mikroszálak pásztázó elektronmikroszkópos felvétele

A szál, mint intermedier

Az intermedier vagy köztitermék leginkább a preparatív szerves kémiából ismert kifejezés. Keletkezhet *in situ* módon, tehát egy megszakítás nélküli folyamat közbeni terméként vagy stabil anyag formájában, amely térben és időben egyaránt jól elkülöníthető és továbbalakítása független az előzményektől. Gyógyszer-technológiai szempontból a hatóanyagtartalmú szálak ez utóbbi kategóriába sorolhatók, hiszen a szálak struktúra egy későbbi gyógyszerforma része.

Tabletta

Egyik lehetséges gyógyszerforma, amely a hatóanyagot nano- és mikroszálba zárva tartalmazza, a tabletta. Ahhoz azonban, hogy a készítményt standardizált módon lehessen előállítani, az alapanyagként szolgáló szálakat egységes méretben, mennyiségben, valamint homogén eloszlásban kell a rendszerbe vinni. Erre a legmegfelelőbb módszer a mikronizálás (örlés), amely során a hosszú szálakból mm-es hosszúságú darabok keletkeznek. Az így kapott intermediert már könnyedén és reprodukálható módon lehet homogenizálni más tablettázási segédanyagokkal, közvetlen préseléses porkeverékké alakítva a rossz folyási tulajdonságú szálakat. A szálak struktúra legfőbb előnye, hogy rosszul oldódó hatóanyagok amorfizálása és a fajlagos felületének növelése révén javítja azok oldhatóságát, egyes vízzoldható polimerekkel extrém nagy oldódási sebességet kölcsönözve a terápiás rendszernek. Lehetőség van a tápcsatorna különböző részein biztosítani a gyors szétáramlást és felszívódást, attól függően, hogy milyen felszívódási alakot kívánunk megcélózni.

Kapszula

Mikronizálás után a szálak önmagukban vagy más segédanyagokkal keverve különböző méretű és kémiai minőségű kapszulákba is tölthetők. Ebben az esetben a legfőbb előny szintén a gyors hatóanyag leadás. A hatóanyag felszabadulását első lépésben a kapszula szétesése befolyásolja, ami anyagonként és kémiai környezetként változik.

További segédanyagok hozzáadásával a mikroszálak folyási tulajdonságai jobbá, nedvesedése egyenletesebbé tehető. Amennyiben a kapszulatok duzzadása következtében bejutott nedvesség a szétesésnél hamarabb képes egységes fázist létrehozni annak belsejében, úgy a kioldódás egyenletesebbé válhat.

A szál, mint végtermék

Eddig a szálak közvetett felhasználási módjainak lehetőségéről esett szó. Bizonyos esetekben viszont az előállítás során nyert forma is felhasználható terápiás célokra anélkül, hogy azt továbbalakítva egy összetettebb rendszer integrált elemévé tennénk.

Nano- és mikroszálak szövet

Az elektrosztatikus, rotációs és pneumatikus szálképzési eljárások a legalkalmasabbak ilyen jellegű készítmények gyártására, hiszen mindhárom módszer esetében gyűjthetők úgy a szálak, hogy azok végül vékony, rendezetlen szálstruktúrájú (ún. nem-szőtt) réteg formájában leválaszthatók a kollektor felületéről. Ezekből a rétegekből nem invazív (sérülést nem okozó), sebek kezelésére szolgáló, mull-lapszerű sebfező rendszerek állíthatók elő [41, 42]. A hordozó polimerek lehetnek önmagukban is antibakteriális hatásúak [43, 44] vagy tartalmazhatnak valamilyen baktérium-ellenes hatóanyagot [45, 46]. A szálak mechanikai tulajdonságaitól függően a lapkák önállóan vagy segédhordozó rendszerrel együtt alkalmazhatók. A sebkezelő rendszereknél fontos megkülönböztetni a biodegradálható (szervezetben lebomló) polimereket azoktól, amelyek csak biokompatibilisek, tehát a szervezet számára tolerálhatók, de nem lebontathatók. Egyes polimerek (pl. a poli-vinilpir-

rolidon-származékok vagy az alginátok) képesek a seb nedvességtartalmának megkötésére is, hidrogéllé alakulnak, majd a seb begyógyulásával kiszáradnak és leperegnek a gyógyult bőrfelületről.

IRODALOM

1. Luo, C.J., Stoyanov, S.D., Stride, E., Pelan, E., Edirisinghe, M.: *Chem. Soc. Rev.* 41, 4708-4735 (2012)
2. US Patent 410404, 1889.
3. Lin, H.-Y., Wang, H.-W.: *Biomatter.* 2, 321-328 (2012)
4. Williamson, M.R., Coombes, A.G.A.: *Biomaterials.* 25, 459-465 (2004)
5. Kumar, M.N.V.R.: *Reactive and Func. Polym.* 46, 1-27 (2000)
6. Yang, C.Y., Chiu, C.T., Chang, Y.P., Wang, Y.J.: *Artif. Cell. Blood Substit. Biotechnol.* 37, 173-176 (2009)
7. Tuzlakoglu, K., Pashkuleva, I., Rodrigues, M.T., Gomes, M.E., van Lenthe, G.H., Müller, R., Reis, R.L.: *J. Biomed. Mat. Res. Part A.* 92, 369-377 (2010)
8. Notin, L., Viton, C., Lucas, J.-M., Domard, A.: *Acta Biomaterialia.* 2, 297-311 (2006)
9. Bonnet, F.: *Ind. Eng. Chem.* 32, 1564-1567 (1940)
10. Gupta, B., Revagade, N., Hilborn, J.: *Prog. Polym. Sci.* 32, 455-482 (2007)
11. US Patent 0280325, 2009.
12. Wang, L., Shi, J., Liu, L., Secret, E., Chen, Y.: *Microelectronic Eng.* 88, 1718-1721 (2011)
13. <http://www.tappi.org/Downloads/Conference-Papers/2011/2011-Innovation-Nonwovens-Conference/11NET05.aspx> [2013.09.20.]
14. Sebe, I.: Preparation and characterization of forspun polyvinylpyrrolidone-iodine fiber mat for wound dressing. P/III-9, PhD Scientific Days, 2013.04.11-12., Budapest.
15. McEachin, Z., Lozano, K.: *J. Appl. Polym. Sci.* 126, 473-479 (2012)
16. Senthilram, T., Mary, L.A., Venugopal, J.R., Nagarajan, L., Ramakrishna, S., Dev, V.R.G.: *Mat. Today* 14, 226-229 (2011)
17. Rajendran, M., Bhattacharya, A.K.: *J. Eur. Ceram. Soc.* 24, 111-117 (2004)
18. Medeiros, E.S., Glenn, G.M., Klamaczynski, A.P., Orts, W.J., Mattoso, L.H.C.: *J. Appl. Polym. Sci.* 113, 2322-2330 (2009)
19. Oliveira, J.E., Medeiros, E.S., Cardozo, L., Voll, F., Madureira, E.H., Mattoso, L.H.C., Assis, O.B.G.: *Mater. Sci. Eng., C.* 33, 844-849 (2013)
20. Abdal-hay, A., Sheikh, F.A., Lim, J.K.: *Colloids Surf., B.* 102, 635-643 (2013)
21. Teo, W.E., Ramakrishna, S.: *Nanotechnology*, 17, 89-106 (2006)
22. Luo, C.J., Stoyanov, S.D., Stride, E., Pelan, E., Edirisinghe, M.: *Chem. Soc. Rev.* 41, 4708-4735 (2012)
23. Molnár, K.: *Magyar Textiltechnika*, 64 (2011)
24. Carothers, W.H., Hill, J.W.: *J. Am. Chem. Soc.* 54, 1579-1587 (1932)
25. US Patent 2206058, 1940.
26. US Patent 2382290, 1945.
27. Butler, I.: *The Sponbonded and Melt blowing Technology Handbook.* Association of the nonwoven Fabrics Industry, 1999.
28. McCulloch, W.J.G.: *Int. Nonwovens J.* 8, 66-72 (1999)
29. US Patent 788842, 1905.
30. Jia, J.: Melt spinning of continuous filaments by cold air attenuation. Thesis, 2010.
31. <http://www.edmund-buehler.de/english/i-rascherstarungstechnologie.pml> [2013.09.11.]
32. US Patent 7763228, 2010.
33. Schmack, G., Tändler, B., Vogel, R., Beyreuther, R., Jacobsen, S., Fritz, H.-G.: *J. Appl. Polym. Sci.* 73, 2785-2797 (1999)
34. US Patent 4855326, 1989.
35. US Patent 5380473, 1995.
36. <http://www.rb.com/our-brands/products-around-the-home> [2013.09.16.]
37. US Patent 2230654, 1939.
38. <http://www.forbes.com/companies/wl-gore-associates/> [2013.09.17.]
39. US Patent 6451059, 2002.
40. Khadka, D.B., Haynie, D.T.: *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 8, 1242-1262 (2012)
41. Chen, J.P., Chang, G., Chen, J.K.: *Colloids Surf., A.* 183-188 (2008)
42. Chong, E.J., Phan, T.T., Lim, I.J., Zhang, Y.Z., Bay, B.H., Ramakrishna, S., Lim, C.T.: *Acta Biomaterialia.* 3, 321-330 (2007)
43. Abdelgavad, A.M., Hudson, S.M., Rojas, O.J.: *Carbohydr. Polym. in press* (2013)
44. Ranjbar-Mohammadi, M., Bahrami, S.H., Joghataei, M.T.: *Mater. Sci. Eng., A. In press* (2013)
45. Nitanan, T., Akkaramongkolporn, P., Rojanarata, T., Ngawhirunpat, T., Opanasopit, P.: *Int. J. Pharm.* 448, 71-78 (2013)
46. Unnithan, A.R., Barakat, N.A.M., Pichiah, T., Gnanesekaran, G., Nirmala, R., Cha Y., Jung, C., El-Newehy, M., Kim, H.Y.: *Carbohydr. Polym.* 90, 1786-1793 (2012)

Érkezett: 2013. szeptember 24.

